

Escola Superior de Saúde Egas Moniz



Mestrado em Biologia Molecular em Saúde

**Análise do Polimorfismo rs266882 no Gene
KLK3 por PCR-RFLP em Casos de Diagnóstico
de Adenocarcinoma da Próstata**

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Biologia Molecular em Saúde

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Alexandra Maia e Silva
Professora Doutora Ana Clara Ribeiro

Joana Sofia Cadilha Franco

Abril 2015

Análise do Polimorfismo rs266882 no Gene *KLK3* por PCR-RFLP em Casos de Diagnóstico de Adenocarcinoma da Próstata

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular do CiiEM, na Escola Superior de Saúde Egas Moniz.

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras armazenadas no Serviço de Anatomia Patológica do CHBM.

O estudo foi autorizado pela Comissão de Ética e Conselho de Administração do CHBM, bem como pela Comissão Nacional de Proteção de Dados.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço às minhas orientadoras Professora Doutora Alexandra Maia e Silva e Professora Doutora Ana Clara Ribeiro pela disponibilidade e apoio constantes, pelo incentivo e por todas as palavras amigas que comigo partilharam. Muito obrigada pelo apoio.

Ao Mestre Fernando Afonso pelo auxílio fundamental no tratamento estatístico dos resultados, sem ele tudo seria mais difícil.

Ao Conselho de Administração e ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Barreiro Montijo por ter possibilitado a realização deste trabalho.

Aos meus colegas por me “aturarem” nos dias menos bons, por partilharem os dias bons e incentivarem até ao fim.

À Mestre Susana Bandarra, à Mestre Ana Fernandes e ao Mestre Paulo Mascarenhas por estarem sempre disponíveis para me ajudarem, por partilharem o seu conhecimento e pela boa disposição constante.

À Sónia Duarte, amiga de uma vida, por estar sempre presente quando se precisa e quando não se precisa também.

Às minhas colegas de mestrado, Filipa Dantas, Joana Sotero, Marlene Duarte e, em particular, à Inês Carvalho, por ajudarem no regresso aos estudos, ouvirem os desabafos e angústias, mas principalmente pelas gargalhadas e bons momentos partilhados.

Aos meus sogros por estarem sempre presentes.

Aos meus pais pelo apoio e amor de uma vida.

Ao Rui e à Catarina, por serem meus, mesmo nas alturas em que eu fui menos deles. Obrigada por estarem sempre comigo, pelo apoio, pela paciência e pelo amor incondicional e inquestionável. Amo-vos.

Resumo

O adenocarcinoma da próstata é uma das neoplasias mais frequentes no género masculino em Portugal e a nível mundial. O antígeno específico prostático (PSA) tem sido utilizado como biomarcador para o rastreio de adenocarcinoma da próstata. No entanto, o aumento dos níveis de PSA não é específico da existência de uma neoplasia maligna, sendo observado em situações benignas. Torna-se urgente encontrar outros biomarcadores para o adenocarcinoma da próstata.

Neste trabalho foi analisado o polimorfismo ARE-I do gene *KLK3* na posição -158 em tecido prostático de indivíduos com diagnóstico de adenocarcinoma da próstata e indivíduos com hiperplasia benigna prostática provenientes do Serviço de Anatomia Patológica do CHBM. Foi utilizada a técnica de PCR-RFLP para análise do DNA extraído de cortes histológicos parafinados.

O genótipo identificado mais frequente foi AA (48 casos), seguido de AG (35) e de GG (13). Todas as amostras de tecido neoplásico e normal, pertencentes ao mesmo indivíduo, apresentaram genótipo idêntico. Não se verificou associação estatisticamente significativa entre o genótipo e o tipo de patologia detetada. O resultado da associação entre o genótipo e o T do estadiamento tumoral foi próximo de ser estatisticamente significativo ($p\text{-value} = 0,08$), sendo que a presença do alelo A revelou associação estatisticamente significativa com o T ($p\text{-value} = 0,046$), mas o alelo G não. O genótipo GG apresentou um valor médio de PSA total de 9,56 ng/ml, superior aos genótipos AA e AG, 8,05 ng/ml e 7,98 ng/ml respetivamente, mas não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os valores médios. O alelo A apresentou também um valor próximo da significância estatística para os níveis de PSA total ($p\text{-value} = 0,053$), mas através do teste t verificou-se não existir diferença entre os valores médios para os alelos A e G. Não se verificou a existência de associação estatística entre o genótipo e *score* de Gleason, volume prostático ocupado pelo tumor ou existência de invasão vascular, perineural ou capsular.

Os níveis de PSA total apresentaram associação estatística significativa com o volume prostático ocupado por tumor ($p = 0,015$), mas não com *score* de Gleason, T ou existência de invasão vascular, perineural ou capsular.

Palavras-chave: adenocarcinoma da próstata, polimorfismo ARE-I, gene *KLK3*, PSA, PCR-RFLP

Abstract

Prostate cancer is one of the most frequent neoplasia in males in Portugal and worldwide. PSA has been widely used as a screening biomarker of prostate cancer. However, raised PSA is not specific of malignancy, it is also observed in benign conditions. There is an urgent need to find new prostate cancer biomarkers.

This study analyzed the ARE-I polymorphism at -158 position of the *KLK3* gene in prostatic tissue from both, individuals diagnosed with prostate cancer and individuals with benign prostatic hyperplasia. This study was conducted with samples from Pathology Service of CHBM. PCR-RFLP analysis using DNA extracted from paraffin embedded tissue sections was the method of choice for this study.

The most frequent identified genotype was AA (48 cases) followed by AG (35) and finally GG (13). All samples of cancer and normal tissue, from the same individual showed the same genotype. There was no statistically significance association between genotype and diagnosis. The result of the association between genotype and the T of tumor stage was nearly statistically significant ($p\text{-value} = 0.08$), and the presence of the A allele showed a statistically significant association with T ($p\text{-value} = 0.046$) but not the G allele. GG genotype had a total PSA average value of 9.56 ng/ml, greater than the AA and AG genotypes, 8.05 ng/ml and 7.98 ng/ml respectively, but there was no statistically significant difference between the average values. The A allele also showed a value close to statistical significance for total PSA levels ($p\text{-value} = 0.053$), but through the t test there was no difference between the mean values for the A and G alleles. There was no statistical association between the genotype and Gleason score, tumor volume or the presence of vascular, perineural or capsular invasion.

The total PSA levels showed statistically significant association with tumor volume ($p = 0.015$), but not with Gleason score, T or existence of vascular, perineural or capsular invasion.

Keywords: prostate cancer, ARE-I polymorphism, *KLK3* gene, PSA, PCR-RFLP

Índice Geral

Índice de Anexos	8
Índice de Figuras.....	11
Índice de Gráficos	13
Índice de Tabelas	14
Lista de Siglas e Abreviaturas	15
1. Introdução Teórica.....	17
1.1. Próstata.....	17
1.1.1. Histologia.....	20
1.2. Hiperplasia Benigna Prostática	24
1.3. Lesões precursoras de Adenocarcinoma da Próstata – Lesão Prostática Neoplásica Intraepitelial de Alto Grau e Atrofia Inflamatória Proliferativa	26
1.4. Adenocarcinoma da Próstata.....	28
1.4.1. Epidemiologia.....	28
1.4.2. Fatores de risco	30
1.4.3. Histologia.....	33
1.4.4. Classificação de Gleason	35
1.4.5. Estadiamento Tumoral (TNM)	37
1.4.6. Mecanismos Moleculares Envolvidos na Tumorigênese do Adenocarcinoma da Próstata	38
1.5. Biomarcadores do Adenocarcinoma da Próstata.....	43
1.5.1. Biomarcadores no Sangue e na Urina.....	43
1.5.2. Marcadores Imunocitoquímicos	45
1.6. Antígeno Específico da Próstata (PSA)	46
1.6.1. Gene <i>KLK3</i> ou <i>PSA</i>	46
1.6.2. Proteína PSA.....	48
1.6.3. Polimorfismo ARE-I do gene <i>KLK3</i>	51

1.7. Objetivos	56
2. Materiais e Métodos.....	57
2.1. Caracterização da amostra	57
2.2. Extração de DNA	57
2.3. Análise do polimorfismo ARE-I do gene <i>KLK3</i>	59
2.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase	59
2.3.2. Amplificação por PCR do polimorfismo ARE-I do gene <i>KLK3</i>	60
2.3.3. Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP).....	61
2.3.4. Restrição do fragmento do gene <i>KLK3</i>	61
2.4. Análise de resultados.....	62
3. Resultados.....	63
3.1. Caracterização da amostra.....	63
3.2. Determinação do genótipo do polimorfismo ARE-I do gene <i>KLK3</i>	66
4. Discussão	75
5. Referências Bibliográficas	79
6. Anexos	90

Índice de Anexos

Anexo 1 – Estadiamento do Cancro da Próstata segundo a AJCC	91
Anexo 2 – Parecer da Comissão Nacional de Proteção de Dados para a realização do estudo	93
Anexo 3 – Pedido de autorização ao Conselho de Administração e Serviço de Anatomia Patológica do CHBM	95
Anexo 4 – Deliberação da Comissão de Ética do CHBM para a realização do estudo	96
Anexo 5 – Protocolo de Coloração de Hematoxilina-Eosina em aparelho automático <i>TissueTek® DRS (Sakura)</i>	97
Anexo 6 – Quadros Referentes à Análise Estatística dos Resultados.....	98
Quadro 1 – Distribuição de diagnósticos.	98
Quadro 2 – Estatística descritiva da idade de toda a amostra.	98
Quadro 3 – Estatística descritiva da idade dos indivíduos com diagnóstico de AP.	99
Quadro 4 – Estatística descritiva da idade dos indivíduos com diagnóstico de HBP.	99
Quadro 5 – Distribuição da amostra em estudo de acordo com a idade.	100
Quadro 6 – Distribuição dos indivíduos com AP de acordo com a idade.....	100
Quadro 7 – Distribuição dos indivíduos com HBP de acordo com a idade.....	100
Quadro 8 – <i>Score</i> de Gleason dos indivíduos com AP.	101
Quadro 9 – T de Estadiamento tumoral dos indivíduos com AP.....	101
Quadro 10 – Estatística descritiva do PSA total dos indivíduos com diagnóstico de AP.....	102
Quadro 11 – Distribuição dos indivíduos com AP por níveis de PSA total.	102
Quadro 12 – Distribuição dos indivíduos com AP por volume prostático ocupado por tumor.....	103
Quadro 13 – Existência de invasão vascular nos indivíduos com AP.	103
Quadro 14 – Existência de invasão perineural nos indivíduos com AP.	103
Quadro 15 – Existência de invasão capsular nos indivíduos com AP.	103

Quadro 16 – Cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg retirado de http://www.koonec.com/k-blog/2010/06/20/hardy-weinberg-equilibrium-calculator	104
Quadro 17 – Genótipo do polimorfismo rs266882 no tecido tumoral de indivíduos com AP.....	104
Quadro 18 – Genótipo do polimorfismo rs266882 no tecido normal de indivíduos com AP.....	104
Quadro 19 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do diagnóstico e respetivo Coeficiente de Contingência.	105
Quadro 20 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do <i>score</i> de Gleason e respetivo Coeficiente de Contingência.	105
Quadro 21 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do T de estadiamento tumoral e respetivo Coeficiente de Contingência.	106
Quadro 22 – Distribuição da presença do alelo A do polimorfismo rs266882 em função do T de estadiamento tumoral e respetivo Coeficiente de Contingência.	106
Quadro 23 – Distribuição da presença do alelo G do polimorfismo rs266882 em função do T de estadiamento tumoral e respetivo Coeficiente de Contingência.	107
Quadro 24 – Estatística descritiva do PSA total em função do genótipo do polimorfismo rs266882.....	107
Quadro 25 – Teste de Kruskal Wallis para avaliar a diferenças entre os valores médios de PSA total de cada genótipo.....	107
Quadro 26 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função dos níveis de PSA total e respetivo Coeficiente de Contingência.	108
Quadro 27 – Distribuição do alelo A do polimorfismo rs266882 em função dos níveis de PSA total e respetivo Coeficiente de Contingência.	108
Quadro 28 – Distribuição do alelo G do polimorfismo rs266882 em função dos níveis de PSA total e respetivo Coeficiente de Contingência.	109
Quadro 29 – Determinação da existência de diferença entre os valores de PSA total na presença do alelo A através do teste t.....	109
Quadro 30 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do volume prostático ocupado por tumor e respetivo Coeficiente de Contingência.	110
Quadro 31 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função da existência de invasão vascular e respetivo Coeficiente de Contingência.	110

Quadro 32 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função da existência de invasão perineural e respetivo Coeficiente de Contingência.....	111
Quadro 33 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função da existência de invasão capsular e respetivo Coeficiente de Contingência.	111
Quadro 34 – Distribuição dos níveis de PSA total em função do <i>score</i> de Gleason e respetiva correlação de Spearman.	112
Quadro 35 – Distribuição dos níveis de PSA total em função do T de estadiamento tumoral e respetiva correlação de Spearman.....	113
Quadro 36 – Distribuição dos níveis de PSA total em função do volume prostático ocupado por tumor e respetiva correlação de Spearman.....	114
Quadro 37 – Distribuição dos níveis de PSA total em função da existência de invasão vascular e respetivo Coeficiente de Correlação.	115
Quadro 38 – Distribuição dos níveis de PSA total em função da existência de invasão perineural e respetivo Coeficiente de Correlação.	115
Quadro 39 – Distribuição dos níveis de PSA total em função da existência de invasão capsular e respetivo Coeficiente de Correlação.	116

Índice de Figuras

Figura 1 – Localização anatômica da próstata e sua relação com os órgãos circundantes, em corte sagital	18
Figura 2 – Localização posterior da próstata e sua relação com a bexiga e vesículas seminais	18
Figura 3 – Zonas da próstata.....	19
Figura 4 – Arranjo concêntrico das glândulas prostáticas em corte transversal	21
Figura 5 – Glândulas prostáticas de tamanho médio a grande com formação de pseudo-papilas, revestidas por estroma fibromuscular.....	21
Figura 6 – Presença de corpos amiláceos no lúmen de glândulas prostáticas normais	22
Figura 7 – Epitélio glandular prostático	23
Figura 8 – Ilustração dos constituintes do epitélio prostático normal	24
Figura 9 – Hiperplasia benigna prostática com dilatação quística das glândulas.....	26
Figura 10 – HGPIN com presença de células atípicas com núcleo hipercromático e nucléolo proeminente numa estrutura glandular benigna	27
Figura 11 – PIA como lesão precursora do adenocarcinoma da próstata.....	28
Figura 12 – Estimativa da incidência do AP a nível mundial por 100.000 indivíduos	29
Figura 13 – Estimativa da mortalidade do AP a nível mundial por 100.000 indivíduos	30
Figura 14 – Glândulas prostáticas malignas com núcleo aumentado e hipercromático, nucléolo proeminente e citoplasma rosa escuro	34
Figura 15 – AP bem diferenciado com pequenas glândulas malignas com pouco ou nenhum estroma entre elas.....	34
Figura 16 – AP com glomerulações intraluminais de células malignas	35
Figura 17 – Diagrama esquemático e histologia dos padrões da classificação de Gleason	36
Figura 18 – Modelo de patogénese molecular do AP proposta por Nelson e colaboradores	39
Figura 19 – Marcação imunocitoquímica em tecido prostático normal.	46
Figura 20 – Família de genes <i>KLK</i>	47

Figura 21 – Região promotora do gene <i>KLK3</i> , com duas regiões ARE (I e II) proximais e um <i>enhancer</i> distal (ARE-III)	48
Figura 22 – Formação de PSA na sua forma ativa	49
Figura 23 – Delimitação ao microscópio da área de interesse, neste caso da zona com tumor.....	58
Figura 24 – Lâminas com delimitação das áreas de interesse	58
Figura 25 – Controlo da eficiência da reação de PCR do segmento de DNA com 300 pb que inclui o polimorfismo ARE-I por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v).	67
Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) dos produtos de restrição para determinação do genótipo do polimorfismo rs266882.	67

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição etária dos indivíduos com AP e HBP.....	63
Gráfico 2 – Distribuição do <i>score</i> de Gleason dos indivíduos com AP.	64
Gráfico 3 – Distribuição dos indivíduos com AP por níveis de PSA total.....	65
Gráfico 4 – Distribuição dos indivíduos com AP de acordo com o volume prostático ocupado por AP.	65
Gráfico 5 – Frequência da ocorrência de invasão vascular, perineural e capsular dos casos de AP.....	66
Gráfico 6 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 pelo <i>score</i> de Gleason.	68
Gráfico 7 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 pelo T do estadiamento tumoral.....	69
Gráfico 8 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 por níveis de PSA total.	70
Gráfico 9 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 de acordo com o volume prostático ocupado por AP.....	71
Gráfico 10 – Distribuição do <i>score</i> de Gleason de acordo com os níveis de PSA total.	73

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação de Gleason Modificada (2005) pela ISUP	37
Tabela 2 – Valores de referência do PSA total em função da idade.....	50
Tabela 3 – Principais estudos sobre o polimorfismo rs266882 e a sua associação ao risco de desenvolver AP e os níveis de PSA no sangue.	54
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados para amplificação de segmento com 300 pb do gene <i>KLK3</i>	60
Tabela 5 – Condições da reação de PCR.	61
Tabela 6 – Distribuição do T do estadiamento tumoral dos indivíduos com AP.	64
Tabela 7 – Frequências dos genótipos do polimorfismo rs266882 de acordo com o diagnóstico.....	68
Tabela 8 – Estatística descritiva dos níveis de PSA total de acordo com o genótipo do polimorfismo rs266882.....	70
Tabela 9 – Frequência da invasão vascular segundo os genótipos do polimorfismo rs266882.....	71
Tabela 10 – Frequência da invasão perineural segundo os genótipos do polimorfismo rs266882.....	72
Tabela 11 – Frequência da invasão capsular segundo os genótipos do polimorfismo rs266882.....	72
Tabela 12 – Distribuição do T de estadiamento tumoral de acordo com os níveis de PSA total.....	73
Tabela 13 – Distribuição volume prostático ocupado por AP de acordo com os níveis de PSA total.	74

Lista de Siglas e Abreviaturas

A – Adenina

ACT – Alfa-1 Anti-Quimiotripsina (do inglês alpha-1-Antichymotrypsin)

AJCC – American Joint Committee on Cancer

AP – Adenocarcinoma da Próstata

AR – Recetor de Androgénio (do inglês Androgen Receptor)

ARE – Elemento de Resposta ao Androgénio (do inglês Androgen Response Element)

AUA – American Urological Association

CHBM – Centro Hospitalar Barreiro Montijo

CiiEM – Centro de investigação interdisciplinar Egas Moniz

D – Ácido Aspártico

Da – Dalton

DHT – 5 α -di-hidrotestosterona

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)

EAU – European Association of Urology

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-Acético (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid)

ERSPC – European Randomized study of Screening for Prostate Cancer

G – Guanina

H – Histidina

HBP – Hiperplasia Benigna Prostática

HGPIN – Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grau (do inglês High Grade Prostatic Intraepitelial Neoplasia)

ICQ – Imunocitoquímica

IGF – Insulin-like Growth Factor

IGFBP – Insulin-like Growth Factor Binding Proteins

ISUP – International Society of Urological Pathology

kb – Kilo bases

KLK3 – Kallikrein-related peptidase 3

miRNA – microRNA

mRNA – RNA mensageiro

PAP – Fosfatase Ácida Prostática (do inglês Prostatic Acid Phosphatase)

pb – pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)

PIA – Atrofia Inflamatória Proliferativa (do inglês Proliferative Inflammatory Atrophy)

PIN – Neoplasia Intraepitelial Prostática (do inglês Prostatic Intraepitelial Neoplasia)

PSA – Antígeno Específico Prostático (do inglês Prostate-Specific Antigen)

RFLP – Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)

S – Serina

SNP – Polimorfismo de Nucleótido Único (do inglês Single Nucleotide Polymorphism)

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TGF- β – Transforming Growth Factor β

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

1. Introdução Teórica

O cancro é umas das doenças humanas com maior taxa de mortalidade em todo o mundo. No caso do género masculino, o adenocarcinoma da próstata é uma das neoplasias mais frequentes, ainda que não a mais mortal (Ferlay *et al.*, 2013). Tendo em conta estes factos, torna-se premente compreender e aprofundar os conhecimentos, nomeadamente quais os mecanismos moleculares envolvidos, identificação e caracterização de genes, incluindo os polimorfismos neste tipo particular de tumor, com o intuito de estabelecer um diagnóstico e respetiva terapêutica cada vez mais precoces.

Ao longo da introdução teórica irei abordar a anatomia e a morfologia da próstata, as patologias mais frequentes deste órgão com realce para o adenocarcinoma da próstata (AP) na sua vertente epidemiológica, de diagnóstico e mecanismos moleculares envolvidos. Será ainda apresentado o gene *KLK3*, o polimorfismo na posição -158 do ARE-I deste mesmo gene e diversos estudos sobre a associação deste polimorfismo com o AP e os níveis de PSA (Antigénio Específico da Próstata) no sangue.

1.1. Próstata

A próstata é uma glândula exócrina que faz parte do sistema reprodutor masculino. Localiza-se na região pélvica, posterior à sínfise púbica, superior à membrana perineal, inferior à bexiga e anterior ao reto, mais concretamente à ampola retal (Figura 1). A base da próstata está em continuidade com a bexiga, envolvendo a porção inicial da uretra, enquanto o ápex se situa junto ao diafragma urogenital (Muruve, 2013), participando no esfíncter uretral.

A irrigação sanguínea da próstata é feita por ramos da artéria ilíaca interna, nomeadamente pela artéria vesical inferior e pela artéria capsular (Standring *et al.*, 2008). A circulação venosa deve-se, em grande parte, às veias capsulares laterais que confluem para complexo venoso dorsal (Cookson, 2012).

Os vasos linfáticos prostáticos drenam para os gânglios linfáticos ilíacos internos e daí para a cadeia retroperitoneal (Rosai, 2011).

A próstata é innervada por nervos periféricos, derivados do plexo prostático, distribuídos uniformemente pelo ápex, zona média e base (Rosai, 2011). As fibras

nervosas simpáticas e parassimpáticas concentram-se no músculo liso que rodeia os ductos e os ácinos glandulares (Cookson, 2012).

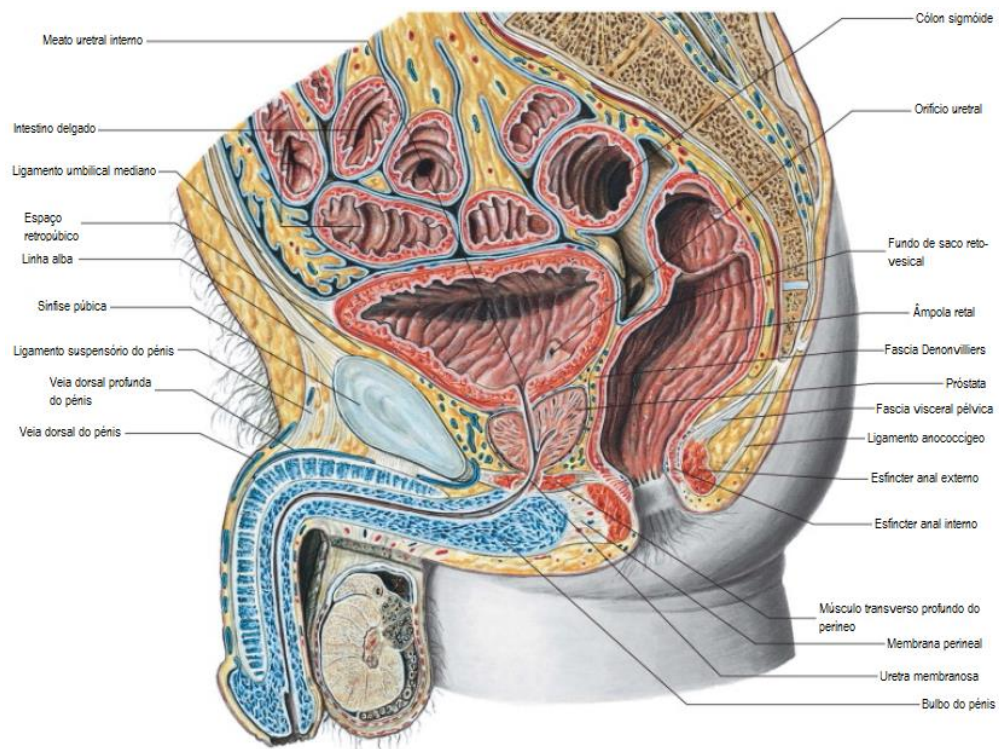


Figura 1 – Localização anatômica da próstata e sua relação com os órgãos circundantes, em corte sagital (adaptada de Standring *et al.*, 2008).

As vesículas seminais situam-se na base da bexiga e sobre a próstata (Figura 2). A união dos canais deferentes formam o ducto ejaculatório antes de entrar na próstata (Muruve, 2013).

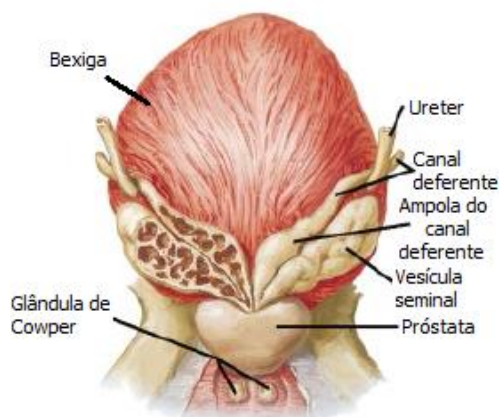


Figura 2 – Localização posterior da próstata e sua relação com a bexiga e vesículas seminais (adaptada de Ovalle & Nahirney, 2013).

A glândula prostática tem forma grosseiramente triangular arredondada, e em situações normais, pesa cerca de 20 g e mede cerca de 3x4x2 cm (Rosai, 2011). A próstata é envolvida por uma cápsula, constituída por tecido conjuntivo condensado e fibras de músculo liso, que está fortemente aderente à próstata (Standring *et al.*, 2008) e é ricamente vascularizada.

Anatomicamente a próstata divide-se em quatro zonas (Figura 3): três de tecido glandular (zona de transição, zona central e zona periférica) e uma de tecido não-glandular (estroma fibromuscular). Esta última ocupa a área entre as zonas periféricas, anterior à uretra pré-prostática. A zona de transição corresponde a aproximadamente 5% do volume da próstata normal, junto à uretra prostática proximal, sendo a zona normalmente afetada pela hiperplasia benigna prostática (HBP) (Zhou, Netto, & Epstein, 2012). A zona central, que representa cerca de 25% do volume da próstata normal e envolve os ductos ejaculatórios, tem uma baixa incidência de patologias, talvez devido ao facto da sua origem embrionária ser diferente das restantes zonas (Standring *et al.*, 2008). Por último, a zona periférica, que representa 70% do volume prostático normal, recobre a área posterior e lateral da zona central e a uretral prostática distal (Zhou *et al.*, 2012). É nesta zona que surgem a maioria dos adenocarcinomas da próstata (AP) (Chung, Sommer, & Brooks, 2012; W. G. Nelson, Carter, Deweese, Antonarakis, & Eisenberger, 2014).

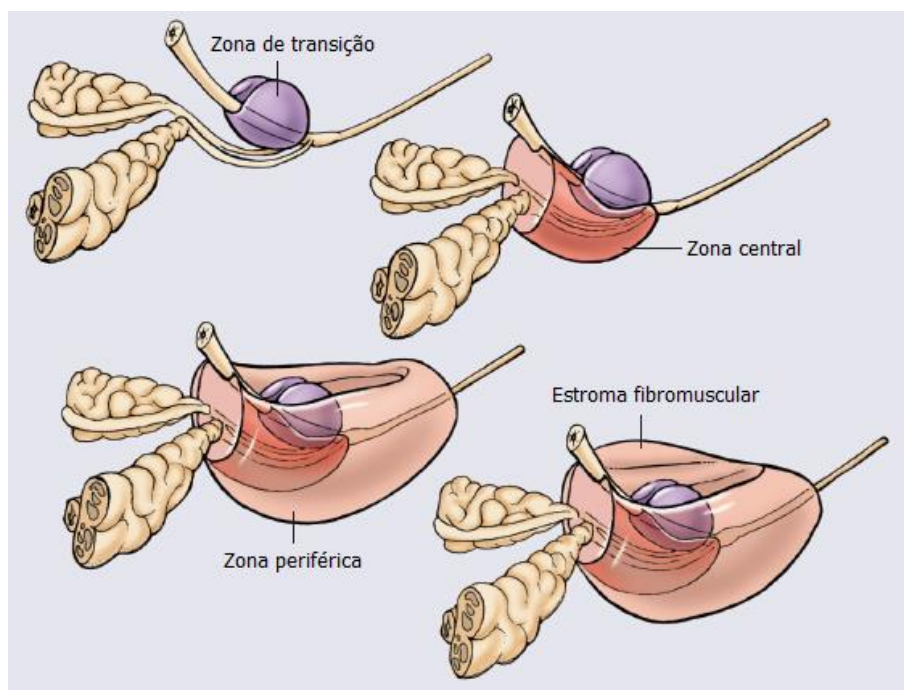


Figura 3 – Zonas da próstata (adaptada de W. G. Nelson *et al.*, 2014).

As hormonas androgénicas e os recetores de androgénio (AR) são fundamentais para o normal desenvolvimento e crescimento da próstata. Neste órgão hormono-dependente, a testosterona é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) pela 5- α -redutase. A DHT é um androgénio mais robusto que a testosterona e liga-se com maior afinidade aos AR, alterando a sua conformação e consequente dissociação dos AR das *chaperones*. Esta modificação promove a dimerização dos AR e o seu transporte para o núcleo, onde se ligam a genes alvo (Green, Mostaghel, & Nelson, 2012). Estes últimos possuem, na região reguladora da transcrição, sequências de DNA denominadas de elementos de resposta aos androgénios (ARE) que permitem que o AR se ligue diretamente ou por *trans*-ativação (Green *et al.*, 2012). O gene *KLK3* é um dos genes ativado desta maneira e quase exclusivamente na próstata.

1.1.1. Histologia

A próstata, tal como foi referido anteriormente, é revestida por uma cápsula de fibras de colagénio e de elastina intercaladas por fibras musculares lisas. O estroma prostático é contínuo com a cápsula, formando lóbulos pouco distintos. O estroma é constituído por fibroblastos, células endoteliais linfáticas e capilares, células de músculo liso irregularmente organizadas e axónios (Berman, Rodriguez, & Veltri, 2012; Gooch, 2011; Ovalle & Nahirney, 2013).

A glândula prostática é constituída por um aglomerado de 30 a 50 glândulas tubuloalveolares compostas que possuem ductos próprios e drenam diretamente na uretra prostática, com um arranjo concêntrico em três camadas (Figura 4): mucosa, submucosa e principal. As glândulas mucosas são as menores das três camadas e têm localização mais próxima à uretra. As submucosas envolvem as primeiras e têm um tamanho maior que estas. As glândulas principais são as mais periféricas, maiores e mais numerosas (Gooch, 2011; Ovalle & Nahirney, 2013).

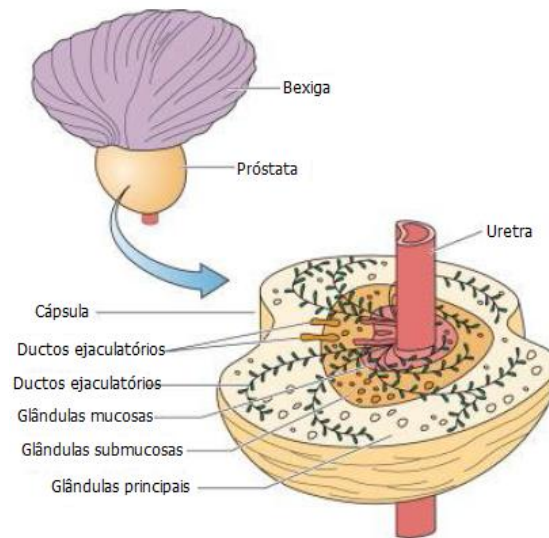


Figura 4 – Arranjo concêntrico das glândulas prostáticas em corte transversal (adaptada de Gooch, 2011).

O contorno das glândulas é irregular, por vezes com pseudo-papilas e formam ácinos e ductos (Figura 5). A diferenciação e crescimento do componente glandular é androgénio dependente. No lúmen glandular podem observar-se corpos amiláceos que são constituídos por detritos celulares e secreções glicoproteicas (Figura 6).

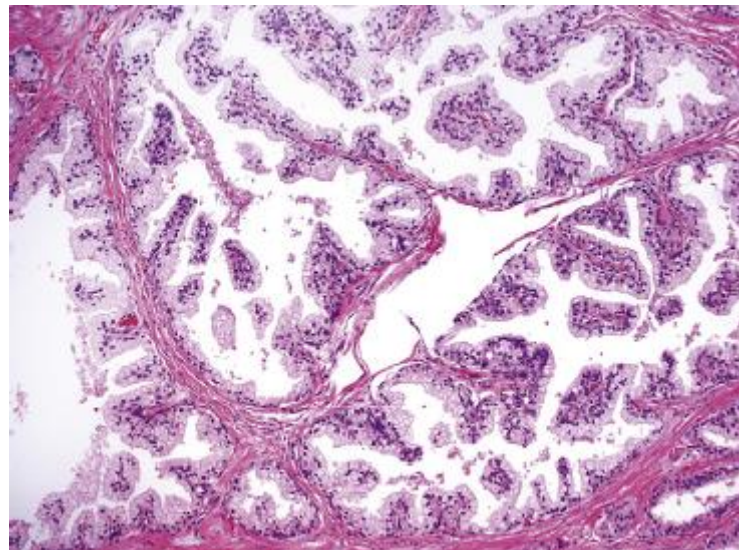


Figura 5 – Glândulas prostáticas de tamanho médio a grande com formação de pseudo-papilas, revestidas por estroma fibromuscular (retirada de Zhou *et al.*, 2012).

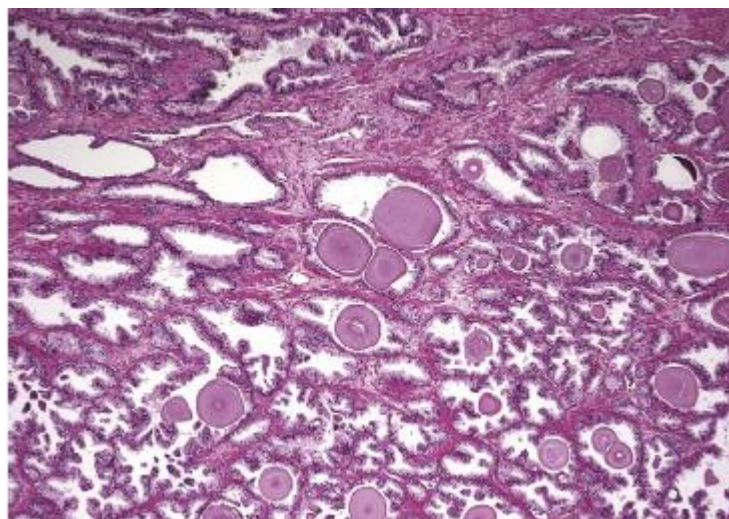


Figura 6 – Presença de corpos amiláceos no lúmen de glândulas prostáticas normais (retirada de Zhou *et al.*, 2012).

O epitélio prostático é composto, principalmente, por dois tipos células, as secretoras e as basais, existindo ainda raras células neuroendócrinas. Estas apresentam-se em epitélio cúbico simples ou pseudoestratificado colunar. A membrana basal é uma estrutura complexa, composta em parte por fibras de colagénio do tipo IV e V, glicosaminoglicanos, polissacáridos complexos e glicolípidos (Berman *et al.*, 2012).

As células secretoras (Figura 7) são as principais constituintes do epitélio prostático, estando bem diferenciadas com baixo índice proliferativo. São células cuboidais/cilíndricas com citoplasma claro, espumoso e com abundantes grânulos secretórios, enzimas e mitocôndrias. As células apresentam-se em paliçada, com a união entre elas a ocorrer através de moléculas de adesão, ligando-se à membrana basal por recetores de integrina. O núcleo é claro com localização apical, sob um aparelho de Golgi de dimensões consideráveis. Os grânulos localizam-se junto ao lúmen da glândula. A membrana citoplasmática luminal destas células possui microvilos que ajudam à movimentação das secreções para os ácinos. As células secretoras produzem um fluido seroso branco que constitui cerca de 15% do sémen, contendo fosfatase ácida prostática (PAP), PSA, iões de cálcio, zinco e outras enzimas proteolíticas envolvidas na liquefação do sémen (Berman *et al.*, 2012; Ovalle & Nahirney, 2013).

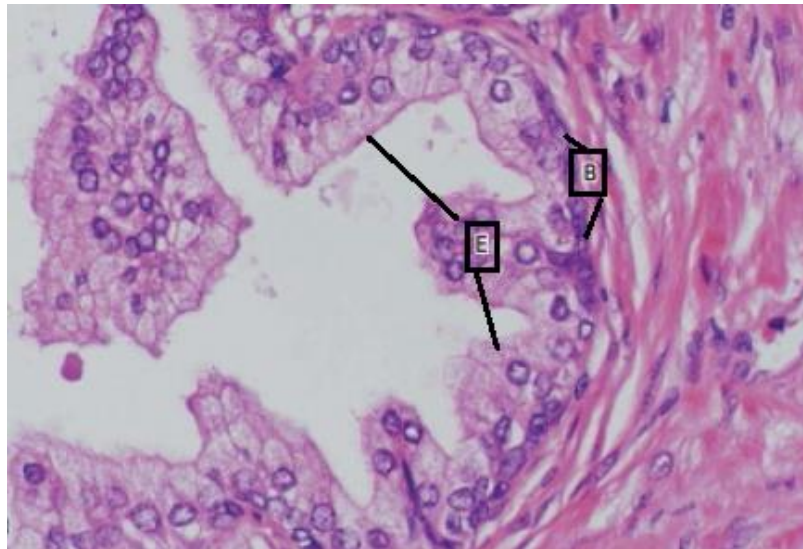


Figura 7 – Epitélio glandular prostático constituído por células secretoras (E) e por uma camada única de células basais (B) (adaptada de Standring *et al.*, 2008).

As células basais são escassas, situando-se entre as células secretoras. Têm forma piramidal com pouco citoplasma, o núcleo tem cromatina condensada com um tom azul acinzentado e nucléolo evidente (Figura 7). Localizam-se sobre a membrana basal e, praticamente, não produzem produtos secretórios, daí não expressarem PAP nem PSA, no entanto, por vezes, apresentam, imunorreactividade para recetores de androgénio (Berman *et al.*, 2012; Gooch, 2011; Ovalle & Nahirney, 2013; Zhou *et al.*, 2012). A presença de células basais permite a diferenciação entre condições benignas e malignas como adenocarcinoma bem diferenciado (Arora, 2014).

As células neuroendócrinas respondem a estímulos neurais através da libertação de hormonas e pro-hormonas por exocitose. Estas células são raras e podem estar presentes, não só no epitélio prostático, mas também no epitélio da uretra prostática. Existem dois tipos de células neuroendócrinas, umas que protudem para o lúmen e possuem microvilos, e outras que têm processos longos tipo dendrites que envolvem as células epiteliais próximas dos nervos aferentes e eferentes. Estas células influenciam o crescimento, a diferenciação e a atividade secretora do epitélio prostático, através de mecanismos parácrinos e autócrinos. As células neuroendócrinas são bem diferenciadas, não expressam PSA nem AR (Berman *et al.*, 2012).

A Figura 8 representa de forma esquemática a estrutura histológica do epitélio prostático.

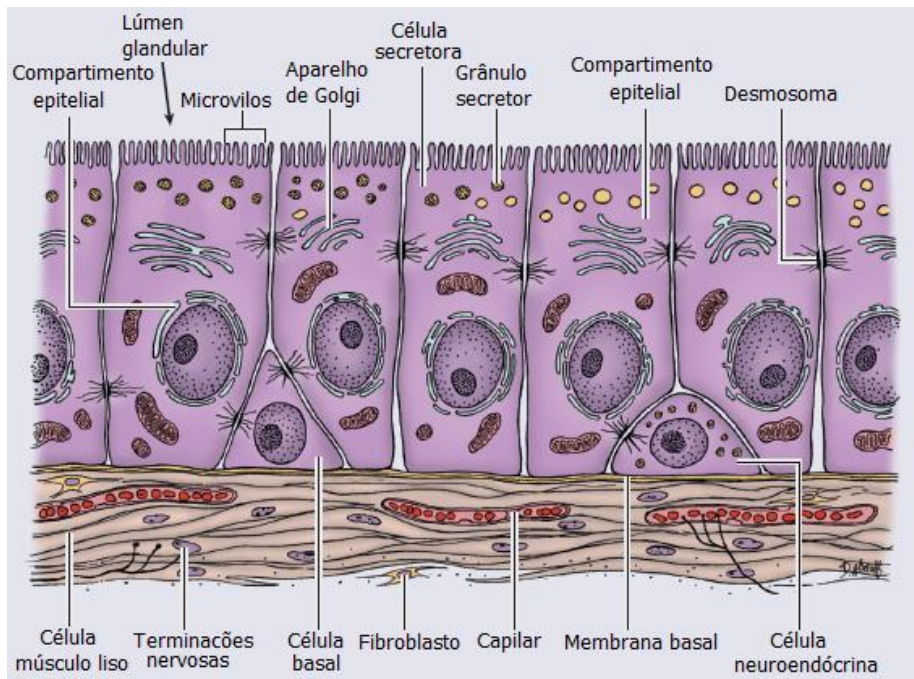


Figura 8 – Ilustração dos constituintes do epitélio prostático normal (adaptada de W. G. Nelson *et al.*, 2014).

1.2. Hiperplasia Benigna Prostática

A hiperplasia benigna prostática (HBP) é uma patologia muito comum nos homens com idade superior a 40 anos. A sua frequência aumenta com a idade, atingindo perto de 50% na 5ª década de vida e os 75% na 8ª (Rosai, 2011). A prevalência é idêntica em homens de raça branca e afro-americanos, no entanto, a severidade e progressão dos sintomas é maior nos segundos, devido, muito provavelmente, aos maiores níveis de testosterona, à maior atividade da enzima 5- α -redutase e à expressão dos recetores de androgénio (Deters, Kim, Leveillee, Moore, & Patel, 2014).

A causa concreta desta patologia é desconhecida, sabendo-se que está fortemente associada ao excessivo crescimento do estroma e elementos glandulares dependentes da testosterona e do seu metabolito di-hidrotestosterona (DHT). Este facto foi

comprovado pelo facto de homens castrados antes da puberdade, ou com doenças que bloqueiam a atividade dos androgénios, não desenvolverem HBP (Roehrborn, 2008).

A DHT, que representa 90% dos androgénios existentes na próstata, é a principal responsável por esta hiperplasia nodular e resulta da metabolização da testosterona circulante pela 5- α -redutase tipo II nas células prostáticas. A DHT liga-se, com maior afinidade que a testosterona, aos recetores de androgénios existentes no núcleo das células, promovendo a proliferação celular através da transcrição de genes androgénio-dependentes, consequente síntese proteica e aumento do número de células prostáticas (Roehrborn, 2008).

Os principais sintomas e sinais são causados pela compressão da uretra e bexiga, devido ao aumento do volume da glândula. Estes incluem o aumento da frequência de micção, urgência em urinar, dificuldade em esvaziar completamente a bexiga, fluxo urinário fraco e/ou interrompido, noctúria, entre outros. Em casos mais graves, pode ocorrer obstrução urinária total, falência renal ou infeções urinárias recorrentes (Deters *et al.*, 2014).

A HBP ocorre na zona de transição da próstata, afetando a próstata periuretral. Há um aumento do volume prostático de duas ou mais vezes relativamente ao peso normal. Macroscopicamente observam-se nódulos bem delimitados, que podem ser sólidos ou quísticos, com consistência firme e elástica. A uretra apresenta-se comprimida e deformada. A região periférica está reduzida a uma estreita faixa junto à cápsula prostática (Damjanov, 2009). Numa primeira fase verifica-se uma maior proliferação do estroma, com maior quantidade de fibras musculares lisas e menos fibras elásticas que no estroma normal. Após esta fase ocorre a hiperplasia do componente glandular (Rosai, 2011).

Ao nível microscópico a HBP caracteriza-se por nódulos hiperplásicos de epitélio glandular proliferativo e estroma fibromuscular. O epitélio glandular é composto por duas camadas de células, uma de células colunares altas e uma camada periférica de células basais. As células glandulares secretoras têm citoplasma claro e núcleo central e regular. É comum encontrar no lúmen das glândulas corpos amiláceos, que podem estar calcificados (Rosai, 2011). Nas glândulas observam-se numerosas projeções papilares e invaginações, assim como áreas de enfarte e focos de metaplasia pavimentosa, podendo estas ser quísticas (Figura 9). Outro aspeto comum é a presença de infiltrado linfocitário no estroma e intraglandular (Ovalle & Nahirney, 2013).

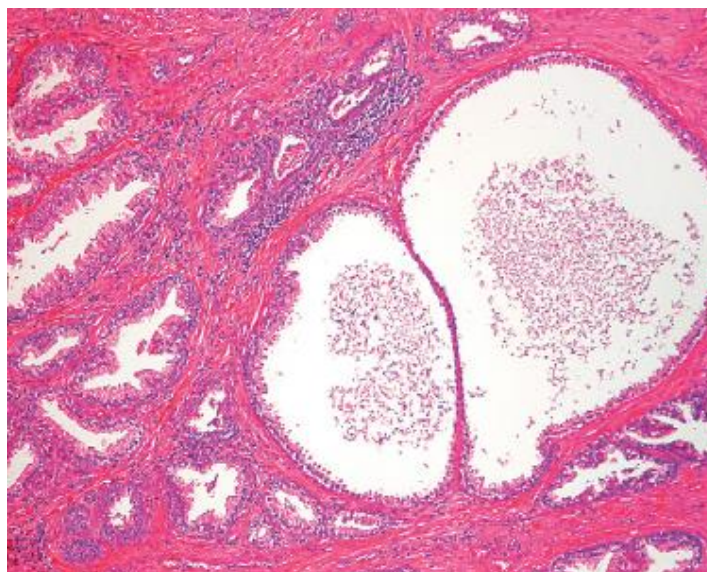


Figura 9 – Hiperplasia benigna prostática com dilatação quística das glândulas (retirada de Rosai, 2011).

1.3. Lesões precursoras de Adenocarcinoma da Próstata – Lesão Prostática Neoplásica Intraepitelial de Alto Grau e Atrofia Inflamatória Proliferativa

As lesões prostáticas neoplásicas intraepiteliais de alto grau (HGPIN) são consideradas precursoras do adenocarcinoma da próstata (AP). As neoplasias intraepiteliais prostáticas (PIN) são caracterizadas pela proliferação limitada de células prostáticas atípicas em estruturas glandulares normais (W. G. Nelson *et al.*, 2014), tal como se pode observar na Figura 10.

Há três razões principais para serem denominadas de lesões precursoras de AP: são habitualmente encontradas em próstatas com AP e de forma contínua com a lesão maligna; surgem, tal como o AP, na zona periférica da próstata, ambos partilham biomarcadores idênticos e possuem várias anomalias genómicas somáticas (W. G. Nelson *et al.*, 2014). As HGPIN são precursoras principalmente de AP de grau moderado ou alto que surgem na periferia da próstata. No entanto, o AP pode surgir sem que haja HGPIN, principalmente no caso de AP de baixo grau, comuns na zona de transição (Epstein, 2012).

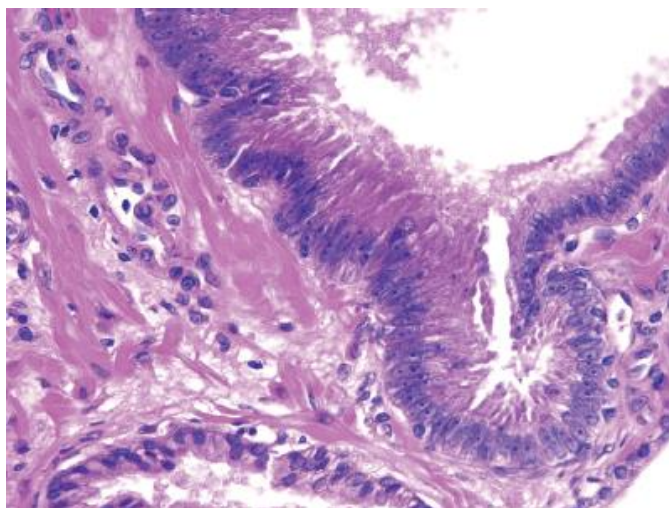


Figura 10 – HGPIN com presença de células atípicas com núcleo hipercromático e nucléolo proeminente numa estrutura glandular benigna (retirada de Epstein, 2012).

Após a detecção de HGPIN numa biopsia, o protocolo de seguimento recomendado, no caso de uma lesão multifocal ou de uma biopsia inicial com menos de seis fragmentos, consiste na repetição da biopsia após um ano (W. G. Nelson *et al.*, 2014). Perante uma lesão unifocal e não extensa, e na ausência de outros indicadores clínicos suspeitos, não há necessidade de repetir a biopsia após um ano (Epstein, 2012), sendo preferível os clínicos seguirem os doentes com análise do PSA, ecografia e exame retal (Ro, Kim, Shen, Amin, & Ayala, 2013).

A história natural de HGPIN não é conhecida e o seu diagnóstico implica necessariamente o recurso a biopsia, o que as torna foco de interesse como alvo de tratamento precoce de situações de AP.

Atualmente pensa-se que lesões de atrofia inflamatória proliferativa (PIA) são lesões precursoras de HGPIN e AP, pois surgem na zona periférica da próstata e algumas células têm alterações genómicas somáticas semelhantes às observadas no AP, tais como hipermetilação das ilhas CpG da região promotora do gene *GSTP1* ou amplificação do braço longo do cromossoma 8 (W. G. Nelson *et al.*, 2014). No entanto, nenhum tratamento ou *follow-up* específico é efetuado quando são detetadas. Estas lesões apresentam, além de atrofia do epitélio, um baixo índice de apoptose e um elevado índice proliferativo, sempre associado a infiltrado inflamatório (Abouassaly, Thompson, Platz, & Klein, 2012).

A PIA é uma lesão regenerativa que surge após infeção ou trauma celular devido a danos oxidativos, hipoxia, infeção ou autoimunidade. A sua capacidade

hiperproliferativa parece ser o aspeto primordial para a evolução para PIN e posteriormente para AP como se vê na Figura 11 (Abouassaly *et al.*, 2012).

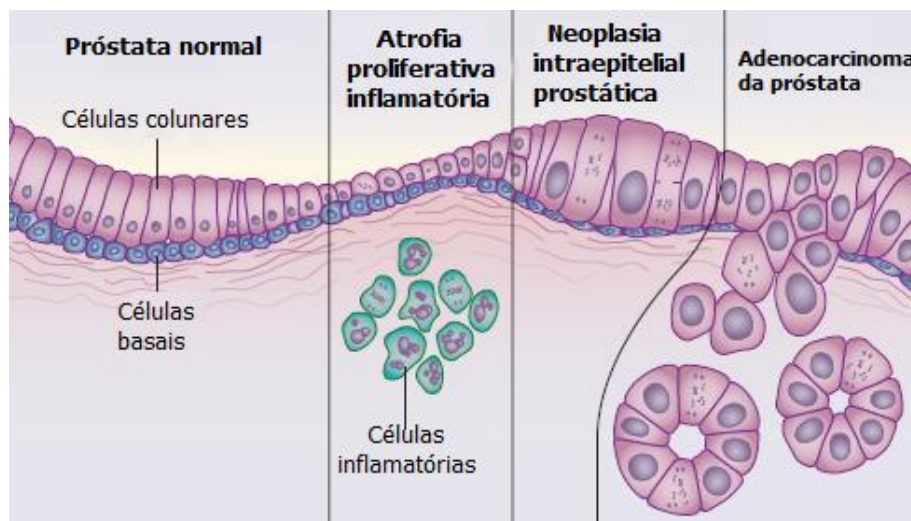


Figura 11 – PIA como lesão precursora do adenocarcinoma da próstata (adaptada de W. G. Nelson *et al.*, 2014).

1.4. Adenocarcinoma da Próstata

O adenocarcinoma da próstata é um dos tumores malignos com maior incidência no género masculino, em seguida descreve-se sucintamente este tipo de tumor relativamente à sua epidemiologia, fatores de risco, histologia, classificação histológica, estadiamento tumoral e ainda alguns dos genes envolvidos na tumorigénese.

1.4.1. Epidemiologia

No ano de 2013 foram diagnosticados mais de 1,1 milhões de novos casos de AP a nível mundial, o que corresponde a 8% do total de novos casos de neoplasias malignas (Ferlay *et al.*, 2013).

O AP representa cerca de 15% de todos os tumores malignos do homem, sendo o segundo mais comum no género masculino a seguir ao carcinoma do pulmão (Ferlay *et al.*, 2013). No entanto, segundo dados do projeto GloboCan (2013) a taxa de mortalidade deste tipo de tumor (6,6%) é bastante inferior à do cancro do pulmão (23,6%). Também a prevalência, ao fim de cinco anos, é mais elevada para o cancro da próstata. Um facto relevante, indicado no GloboCan (2013), é que 70% dos novos

casos de tumores da próstata ocorrem nos países mais desenvolvidos. As regiões do mundo com maior taxa de incidência deste tipo de tumor são a Oceânia e a América do Norte (Figura 12). A incidência é também elevada nas Caraíbas, América do Sul e na África de Sul. Os países do Sul da Ásia e de África têm taxas de incidência menores para esta patologia, o que se pode explicar devido não só a uma menor esperança de vida, mas também ao facto do rastreio através da análise de PSA, comum e frequente nos países mais desenvolvidos, não estar disponível de forma generalizada e/ou sistematizada nestas regiões.

Segundo o GloboCan (2013), no caso particular da Europa, o AP é o cancro com maior incidência no homem, 22,2%, em comparação com 16,2% do cancro do pulmão ou 12,8% do cancro colo-retal.

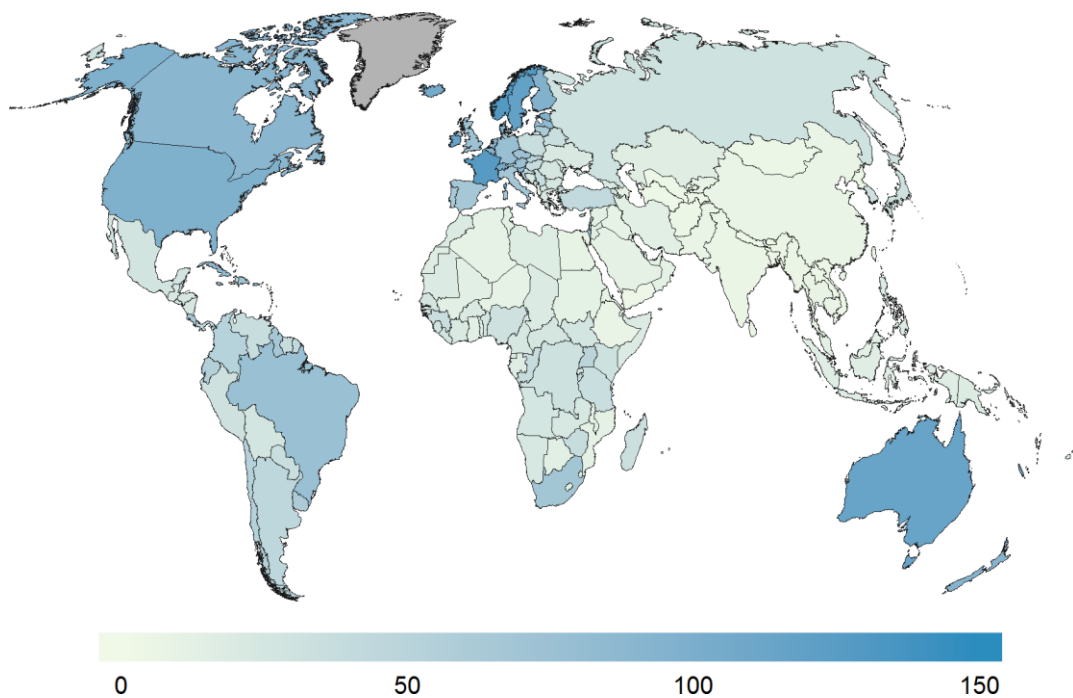


Figura 12 – Estimativa da incidência do AP a nível mundial por 100.000 indivíduos (retirada de Ferlay *et al.*, 2013).

A taxa de mortalidade é maior na população negra e significativamente menor na população asiática. Estima-se que, no ano de 2012, cerca de 307.000 homens morreram devido a este cancro, representando a 5ª causa de morte por cancro no homem (Ferlay *et al.*, 2013). Observando a Figura 13, observa-se uma uniformidade ao nível da mortalidade entre os países mais desenvolvidos e os países em vias de

desenvolvimento, o que não reflete a diferença na taxa de incidência verificada entre estes países.

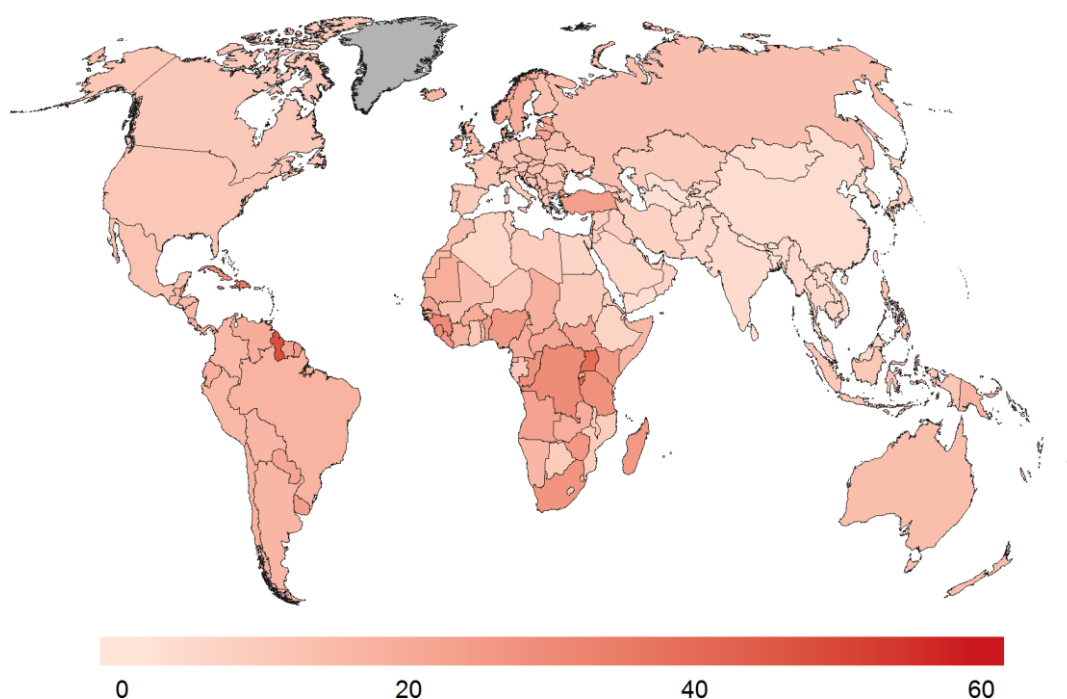


Figura 13 – Estimativa da mortalidade do AP a nível mundial por 100.000 indivíduos (retirada de Ferlay *et al.*, 2013).

Em Portugal, o cancro da próstata teve uma incidência padronizada de 89,7 novos casos por 100.000 habitantes de acordo com dados da Direção-Nacional da Saúde (2013), um risco ligeiramente superior ao dos países do Sul da Europa (Ferlay *et al.*, 2013). No entanto, a taxa de mortalidade padronizada tem vindo a descer, ainda que ligeiramente, entre 2007 e 2011, de 23,9 para 22,3 por 100.000 habitantes. É de salientar que, em Portugal, as regiões com taxas de mortalidade padronizadas mais elevadas são as de Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo (Direção-Nacional da Saúde, 2013).

1.4.2. Fatores de risco

Existem alguns fatores que parecem contribuir para o desenvolvimento de AP, como a dieta rica em gorduras e pobre em vegetais e fruta ou predisposição familiar. Todavia, o principal fator de risco é a idade, sendo raro antes dos 40 anos e aumentando significativamente a incidência por cada década de vida do homem. Dados da *American Cancer Society* (American Cancer Society, 2015) referem que na 7ª década

de vida, um homem em cada dezasseis terá AP e na 8ª década este número sobe para um em nove.

Uma dieta alimentar rica em gorduras, principalmente polinsaturadas, e pobre em vegetais é mais comum nos países mais desenvolvidos, como os da América do Norte e do Norte da Europa, que possuem elevadas taxas de incidência deste tipo particular de tumor. Foi demonstrada a importância do estilo de vida no desenvolvimento desta neoplasia, através do estudo de população emigrante do Japão (com baixa incidência de AP) para os Estados Unidos da América, onde adquiriram não só os hábitos de vida ocidentais como também adquiriram um risco mais elevado para este tumor do que tinham no seu país de origem (Gooch, 2011). Alterações induzidas por lípidos ao nível do perfil hormonal, o efeito de metabolitos lipídicos como proteínas ou aumento dos níveis de *stress* oxidativo induzido por lípidos podem justificar este aumento de risco para as populações migrantes (Bostwick, Cheng, & Meiers, 2014).

A raça dos indivíduos parece contribuir para o risco de AP, contudo, este facto pode ser reflexo de outros fatores, tais como diferentes exposições a potenciais fatores de risco (ambientais, por exemplo) ou diferenças ao nível do sistema de deteção e tratamento dos doentes oncológicos. Raças diferentes têm frequências alélicas diferentes como por exemplo de microssatélites em *locus* do recetor de androgénio ou diferentes polimorfismos, tais como o número de repetições de trinucleótidos (Bostwick *et al.*, 2014).

A confeção de carnes vermelhas a alta temperatura ou usando carvão, também pode contribuir para o aumento do risco de AP, pois estes métodos de confeção provocam a formação de substâncias carcinogénicas como aminas aromáticas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (W. G. Nelson *et al.*, 2014).

O consumo de laticínios também parece estar associado a um maior risco de AP, devido ao aumento da ingestão do cálcio (Chan *et al.*, 2001), e também pela ativação em excesso da via de sinalização mTORC1, envolvida na síntese proteica (Melnik, John, Carrera-Bastos, & Loren, 2012).

Por outro lado, o consumo de vegetais, como por exemplo o tomate que é rico em licopeno, e micronutrientes antioxidantes, como por exemplo a vitamina E ou o selénio, diminuem o risco de desenvolver cancro da próstata. A vitamina E (α -tocoferol) tem a particularidade de impedir a proliferação de células tumorais prostáticas através da indução da apoptose (Sigounas, Anagnostou, & Steiner, 1997).

Um estudo recente menciona que o licopeno, que possui uma ação antioxidante, diminui a metilação da região promotora do gene *GSTP1* (que codifica para uma proteína envolvida no metabolismo xenobiótico) em linhas celulares de AP androgénio-dependentes (Fu *et al.*, 2014).

No entanto, mais estudos estão a ser realizados para compreender os reais benefícios, não só de suplementos alimentares mas também da dieta na diminuição do risco de desenvolvimento deste e doutros tipos de tumor.

O efeito protetor do café foi analisado por Wilson e colaboradores (2011), que comprovou um efeito inversamente proporcional entre o consumo de café e o risco de AP mais agressivo. Esta associação também pode estar relacionada com o facto de o café ser rico em substâncias antioxidantes.

O tabagismo tem sido associado não a uma maior incidência de AP (Rohrmann *et al.*, 2007), mas sim a uma maior agressividade do tumor e a uma taxa de mortalidade mais elevada, quando comparada com não fumadores ou ex-fumadores há mais de dez anos, bem como a um risco de recorrência mais elevado (Kenfield, Stampfer, Chan, & Giovannucci, 2011; Rohrmann *et al.*, 2007).

A ação das hormonas, em particular dos androgénios, influencia o desenvolvimento de AP, tendo Bostwick e colaboradores (2004) afirmado que qualquer homem com androgénios irá desenvolver AP, ainda que microscópico, basta que viva tempo suficiente para tal. A doença não ocorre em homens castrados antes da puberdade e a sua incidência é muito baixa em doentes com cirrose hepática com hiperestrogenismo associado (Rosai, 2011). Os androgénios afetam as taxas de crescimento e progressão deste tipo de tumor, em resultado de alterações no metabolismo da testosterona. Bostwick (2014) refere que a presença de elevadas concentrações de testosterona e do seu metabolito ativo di-hidrotestosterona (DHT) durante décadas, pode aumentar o risco de desenvolver AP.

Níveis elevados de *Insulin-like Growth Factor* (IGF), que promove a proliferação e inibe a apoptose das células prostáticas normais e tumorais *in vitro* (Abouassaly *et al.*, 2012), e de *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins* (IGFBP) no sangue, demonstraram constituir fator de risco moderado para o desenvolvimento de AP. Os níveis destas proteínas estão relacionados com o tipo de dieta e o estilo de vida (Roddam *et al.*, 2008).

Diferentes estudos comprovaram a existência de predisposição familiar para esta neoplasia. A metanálise realizada por Zeegers e colaboradores (2003) mostra que o

risco aumenta com o número de familiares diagnosticados, o grau de parentesco e a idade em que foram diagnosticados. O risco é duas vezes maior se um familiar de 1º grau, como o pai ou irmão tiver AP e cinco a dez vezes maior se dois ou mais parentes de 1º grau forem afetados (Zeegers *et al.*, 2003).

A maioria dos AP são esporádicos, mas tal como acontece em outras neoplasias, há diferentes genes identificados como genes de suscetibilidade para o aparecimento destes tumores. Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, associados ao cancro de mama familiar, também parecem estar relacionados com uma pequena fração de tumores da próstata hereditários (Bostwick *et al.*, 2014). Outros genes identificados em estudos de *linkage*, como genes de suscetibilidade foram o *Hereditary Prostate Cancer – 1 (HPC-1)/RNASEL*, *HPC-2/ELAC2* ou o *MSR1* (Lessick & Katz, 2006). As funções biológicas dos genes de suscetibilidade na próstata são idênticas às funções já descritas, para outro tipo de tumores: genes mediadores de inflamação (por exemplo: *MIC1* ou *MSR1*), enzimas antioxidantes (por exemplo: *MSR1* ou *PON1*), reparação de DNA (por exemplo: *OGG*, *CHEK2* ou *BRAC2*), indutores de apoptose (por exemplo: *RNASEL*) ou de suscetibilidade a infeções (por exemplo: *MSR1*, *RNASEL* ou *TLR4*) (Abouassaly *et al.*, 2012).

1.4.3. Histologia

A maior parte dos AP surgem na zona periférica e são multifocais, sendo detetados clinicamente, na maioria das vezes, por análise de rotina do PSA. Outros métodos de diagnóstico clínico utilizados são o toque retal e a ecografia transretal (Rosai, 2011). Macroscopicamente, apenas são visíveis lesões extensas, de cor branca acinzentada ou amarelada, consistência firme e limites mal definidos.

Microscopicamente, existem diversos padrões de crescimento tumoral: acinar, fuso-acinar, cribiforme, papilar, trabecular e sólido (Ro *et al.*, 2013).

A maioria das lesões é moderadamente diferenciada com glândulas bem definidas. Os AP são constituídos por pequenas glândulas revestidas por uma única camada de células epiteliais cuboidais, e camada de células basais ausente. Nas glândulas com alterações neoplásicas, as células estão amontoadas e não apresentam pseudo-papilas nem irregularidade no seu contorno luminal. As células tumorais possuem núcleo aumentado, redondo e hipercromático com um ou mais nucléolos

proeminentes e marginais. O citoplasma tem aspecto variável de pálido a rosa escuro (Figura 14).

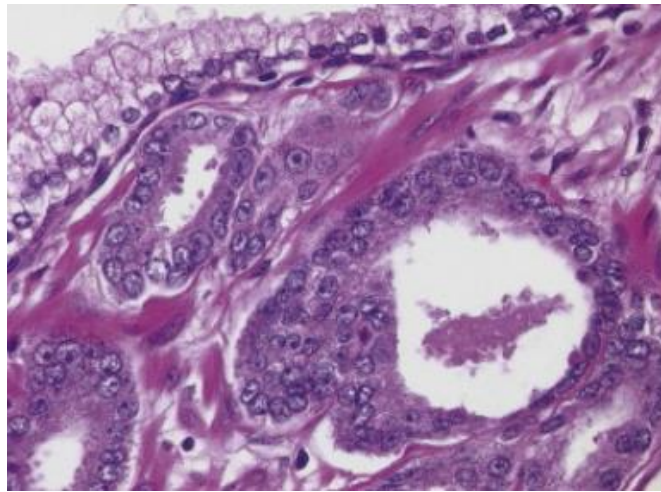


Figura 14 – Glândulas prostáticas malignas com núcleo aumentado e hiper cromático, nucléolo proeminente e citoplasma rosa escuro (retirada de Kumar, Abbas, & Aster, 2013).

O estroma entre as glândulas está ausente ou presente em pequena quantidade (Figura 15), pode apresentar uma combinação de hiper celularidade e depósitos de substância basófila designada de fibroplasia mucinosa (Rosai, 2011). Com o aumento do grau de agressividade do tumor podem ser observadas mitoses. Outros achados histológicos são a presença de calcificações luminiais e estromais, glomerações intraluminais – glândulas dilatadas com proliferação intraluminal de epitélio maligno de padrão cribiforme (Figura 16), invasão perineural circunferencial e invasão de vasos linfáticos e sanguíneos.

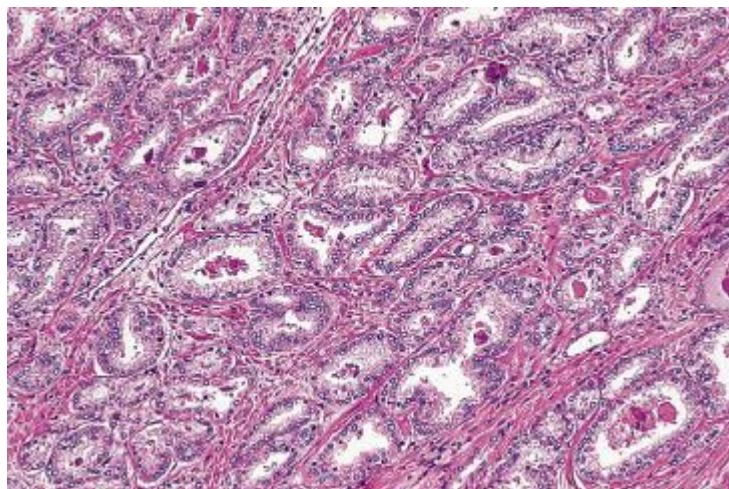


Figura 15 – AP bem diferenciado com pequenas glândulas malignas com pouco ou nenhum estroma entre elas (retirada de Ro *et al.*, 2013).

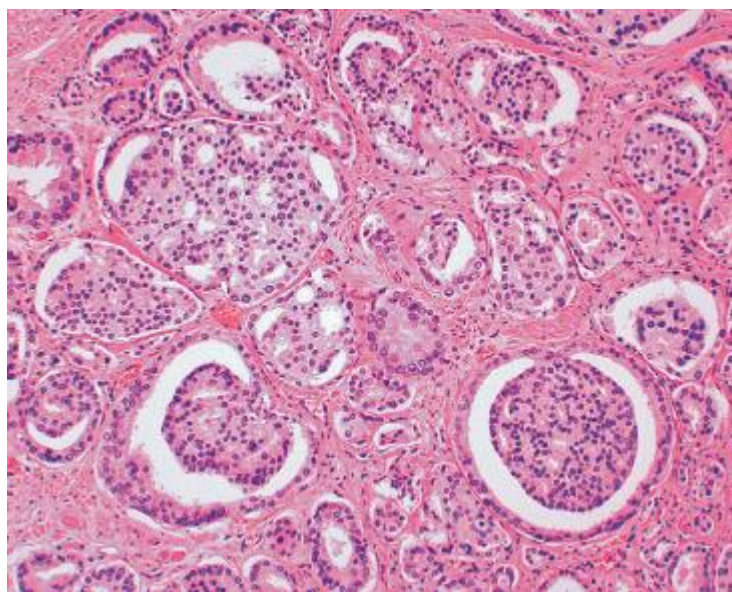


Figura 16 – AP com glomerulações intraluminais de células malignas (retirada de Ro *et al.*, 2013).

1.4.4. Classificação de Gleason

A classificação dos tumores da próstata é realizada através da classificação de Gleason. Esta classificação surgiu em 1966 através de Donald F. Gleason que a baseou nos padrões histológicos de crescimento tumoral, utilizando cinco graus de acordo com a arquitetura glandular (Figura 17). Os padrões 1, 2 e 3 representam tumores com semelhanças às glândulas prostáticas normais e os padrões 4 e 5 alterações crescentes ao normal. O *score* final é dado pela soma dos dois padrões mais observados (Egevad, Mazzucchelli, & Montironi, 2012). Por exemplo, se o padrão mais observado é o 4 e o segundo mais observado é o 3, o *score* de Gleason é 7. Esta classificação é uma ferramenta importante para determinar a evolução do cancro, quanto maior o *score* de Gleason maior o risco de progressão do cancro com ou sem tratamento (Fine *et al.*, 2012).

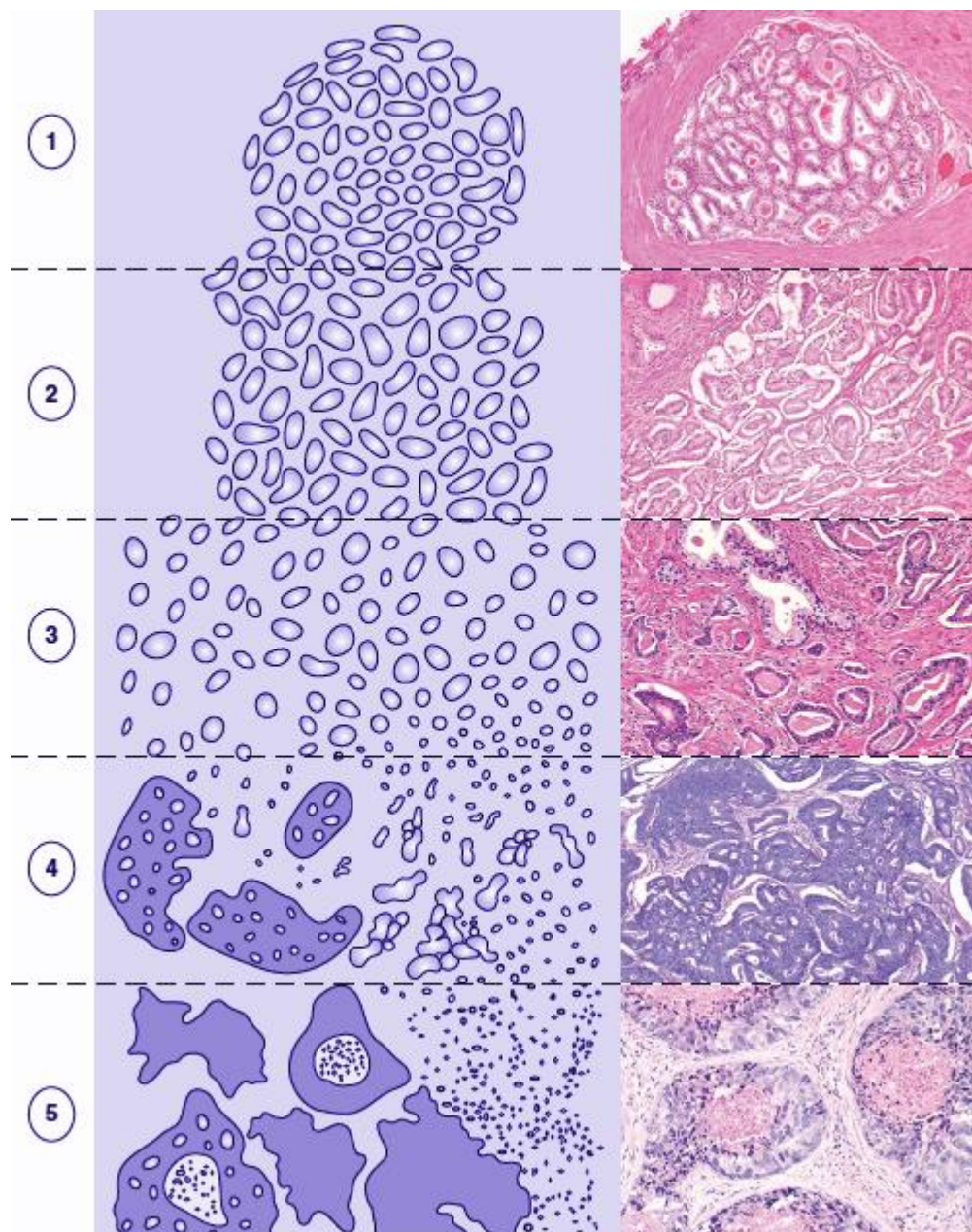


Figura 17 – Diagrama esquemático e histologia dos padrões da classificação de Gleason (adaptado de Epstein, 2012).

Ao longo dos anos esta classificação tem sido modificada, mas a sua essência permanece igual. Na Tabela 1 vemos a classificação atualmente utilizada, que foi adotada em 2005 na reunião de consenso da Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP). Com esta revisão, um *score* de $3 + 3 = 6$ é considerado de baixo risco de recidiva após tratamento inicial (W. G. Nelson *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Classificação de Gleason Modificada (2005) pela ISUP (adaptada de Egevad *et al.*, 2012).

Padrões histológicos da classificação de Gleason
1 – Nódulo circunscrito compacto de ácinos de tamanho médio, separados, uniformes e de forma arredondada ou oval (glândulas maiores do padrão 3).
2 – Semelhante ao padrão 1, relativamente circunscrito, mas nos limites do nódulo de tumor pode haver infiltração mínima; as glândulas são menos organizadas e não tão uniformes como no padrão de Gleason 1.
3 – Discretas unidades glandulares: tipicamente glândulas menores do que nos padrões Gleason 1 ou 2; infiltração nos e entre ácinos não neoplásicos; marcada variação de tamanho e forma; pequenos nódulos tumorais cribriformes e finamente delimitados.
4 – Glândulas microacinares condensadas: glândulas mal definidas, com lúmen deformado; glândulas grandes cribriformes de limites mal definidos; podem existir células com citoplasma claro (padrão hipernefratomóide).
5 – Sem qualquer diferenciação glandular, composto por folhetos contínuos, filas ou células individuais; comedocarcinoma com necrose central, rodeada por massas de aspeto papilar, cribriforme ou sólido.

1.4.5. Estadiamento Tumoral (TNM)

O estadiamento tumoral pretende descrever a gravidade do cancro para cada indivíduo, baseando-se no tamanho, localização e extensão do tumor inicial. Desta forma é possível fazer o prognóstico e definir qual o tratamento mais adequado a cada pessoa (American Joint Committee on Cancer, 2015).

Existem quatro tipos de estadiamento tumoral: 1) clínico, que determina qual o tipo de cancro e quais os locais atingidos usando exames físicos, análises, biopsias e exames de imagem; 2) patológico, que é realizado em doentes submetidos a operação de remoção do tumor ou exploratória em conjunto com os dados do estadiamento clínico; 3) pós-terapêutica ou pós-terapêutica neoadjuvante, que avalia o que resta do cancro após terapia sistémica e/ou radioterapia local antes de efetuar cirurgia ou quando esta não é realizada e por último, 4) restadiamento, quando há recorrência do cancro após tratamento, utilizado como auxiliar na decisão terapêutica.

O estadiamento compreende três pontos: o local e tamanho/extensão do tumor (designado por T), o número de gânglios linfáticos locais atingidos (com designação de N) e, por fim, a existência de metástases à distância (designado por M). No Anexo

1 são apresentadas as definições do TNM para este tumor indicadas pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

Os grupos de prognóstico são definidos através dos dados do estadiamento tumoral, em conjunto com a informação do *score* de Gleason e os valores do PSA séricos (Anexo 1), de acordo com a AJCC. Este agrupamento permite facilitar a definição das terapêuticas mais adequadas a cada caso específico. Esta classificação utiliza numeração romana e varia entre os estadios I (doença menos avançada) até ao estadio IV (doença mais avançada) (American Joint Committee on Cancer, 2009).

1.4.6. Mecanismos Moleculares Envolvidos na Tumorigénese do Adenocarcinoma da Próstata

A patogénese molecular do AP não é totalmente conhecida, pelo que Nelson e colaboradores (2014) propõem um modelo representado esquematicamente na Figura 18. Se não forem consideradas as mutações germinativas de genes como *RNASEL* ou *MSRI*, a cascata de alterações génicas surge com o aparecimento de atrofia inflamatória proliferativa na próstata.

A hipermetilação das ilhas CpG da região promotora do gene *GSTP1*, que codifica a glutathione s-transferase da classe π , é a alteração génica mais observada no AP (Lin *et al.*, 2001). No epitélio prostático normal, o *GSTP1* é expresso em níveis significativos nas células basais e, em menor escala, nas células secretoras (W. G. Nelson *et al.*, 2014). Verificou-se que em cerca de 70% das lesões de HGPIN e 100% dos AP, esta enzima está ausente. Este facto, que resulta da hipermetilação das ilhas CpG, tem como consequência um aumento do número de danos acumulados por *stress* oxidativo (Lin *et al.*, 2001; Schneckengerber, Karius, & Diederich, 2014).

O mecanismo que origina esta metilação do DNA não é conhecido, mas sabe-se que estas células apresentam vantagem sobre as células normais nas fases mais precoces de AP (W. G. Nelson *et al.*, 2014). Maldonado e colaboradores (2014) referem que uma maior metilação da região promotora do *GSTP1* está associada a um risco mais elevado de recorrência da doença em pacientes com AP em estadios mais precoces.

Dada que a epimutação deste gene ocorre numa fase inicial dos AP, este pode ser detetado em DNA retirado de fluidos corporais como a urina (Schneckengerber *et al.*, 2014).

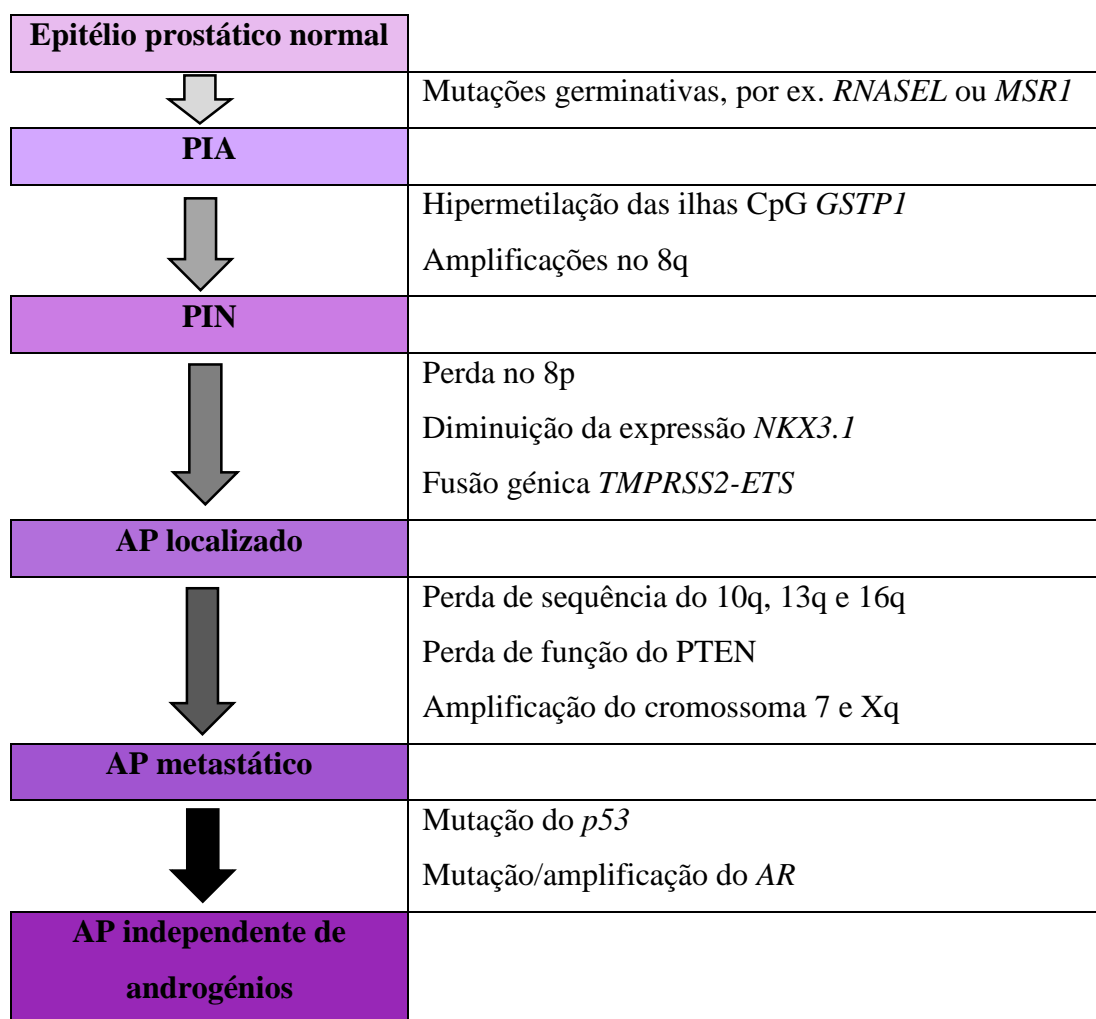


Figura 18 – Modelo de patogénese molecular do AP proposta por Nelson e colaboradores (adaptada de W. G. Nelson *et al.*, 2014).

A amplificação do braço longo do cromossoma 8 é comum nos AP, principalmente nos metastáticos. Apesar de não se saber exatamente qual o gene alvo deste ganho, pensa-se que este pode ser o *c-Myc*, pois localiza-se em 8q.24 e a proteína por ele codificada participa no crescimento celular, diferenciação e apoptose. No entanto, estudos revelaram que a sobre-expressão da proteína *c-Myc* não está associada à amplificação da região 8q.24, pois esta ocorre quer em situações de PIN e AP primários como metastáticos e que esta pode dever-se a mecanismos regulatórios alternativos (Gurel *et al.*, 2008). O estudo de Vander Griend, Litvinov, & Isaacs (2014), refere que a ativação do *AR* nas células prostáticas neoplásicas induz a expressão do gene *c-Myc* e, consequentemente, o crescimento celular, ao contrário do que se observa nas células normais.

O gene *NKX3.1*, localizado no 8p21, é um gene androgénio-dependente específico da próstata e está associado à morfogénese prostática, à produção de secreção prostática e à reparação de danos no DNA, através da interação e regulação do gene *ATM* (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Bowen, Ju, Lee, Paull, & Gelmann, 2013). A perda de um ou dos dois alelos deste gene é mais frequente à medida que as lesões prostáticas se agravam (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999), sendo considerado um gene supressor de tumor (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2014; Thangapazham *et al.*, 2014). A diminuição da expressão do gene aumenta a suscetibilidade das células prostáticas aos danos oxidativos, exacerbados pela diminuição da expressão do gene *GSTP1*, como descrito anteriormente (Bhatia-Gaur *et al.*, 1999; Bowen *et al.*, 2013).

Uma alteração genómica característica dos AP é o rearranjo cromossómico que origina formação de transcritos resultantes da fusão entre o gene regulado por androgénio *TMPRSS2*, que codifica uma serina protease nas células secretoras (localizado no cromossoma 21q22) e genes de fatores de transcrição *ETS*, tais como o *ERG* (situado na mesma região cromossómica), o *ETV1* e o *ETV4* (W. G. Nelson *et al.*, 2014). A fusão mais comum nos AP é a *TMPRSS2-ERG*, presente em cerca de 60% dos tumores prostáticos.

Este rearranjo parece dever-se a um erro durante *trans*-ativação do *TMPRSS2* pelo recetor de androgénio e pela ligação e dissociação da topoisomerase TOP2B, que provoca a quebra da cadeia dupla de DNA e a recombinação não homóloga com os genes da família *ETS* (W. G. Nelson *et al.*, 2014; Petrovics *et al.*, 2005). Este evento precede a capacidade de invasão das células tumorais (Klezovitch *et al.*, 2008).

O estudo de Thangapazham e colaboradores (2014) demonstra que os genes *ERG* e *TMPRSS2-ERG* são regulados negativamente pelo *NKX3.1*. A perda do *NKX3.1* induz a ativação do protooncogene *ERG*, dois eventos favorecedores da tumorigénese prostática. O aumento da expressão de *ERG*, devido à fusão com o *TMPRSS2*, estimula o *c-MYC* e, por consequência, o crescimento celular. Impede ainda a diferenciação normal do epitélio prostático através do bloqueio da expressão do *AR* (Burdova, Bouchal, Tavandzis, & Kolar, 2014).

A deteção do gene *TMPRSS2-ERG* tem sido estudada para determinar a sua fiabilidade como biomarcador de AP, nomeadamente através de análise da urina em conjunto com o *prostate cancer antigen 3* (PCA3) (Wei, 2015).

A progressão de PIN para AP localizado, acompanha o acumular de alterações genómicas nas células. A perda do 10q, onde o *PTEN* (10q23.3), um gene-alvo se

localiza, é um acontecimento comum (J. Li, 1997). O PTEN é uma fosfatase que inibe a via de sinalização fosfatidilinositol 3'-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt), necessária para a progressão do ciclo celular e sobrevivência. O PTEN é expresso nas células epiteliais prostáticas normais e nas células de PIN, no entanto está sub-expresso ou mesmo ausente nas células tumorais (Mcmenamin, Soung, & Perera, 1999). Diferentes mutações no gene *PTEN* foram já descritas em tumores da próstata, tais como deleções homozigóticas, perda de heterozigotia, mutações e hipermetilação das ilhas CpG (W. G. Nelson *et al.*, 2014).

A perda de porções dos 13q e 16q surge nas células neoplásicas e contribui para a sua progressão. No 13q existem alguns genes como o *FOXO1A*, um fator de transcrição que inibe a regulação mediada por androgénios e pelo AR, e é inativado pela fosforilação mediada pelo PIK3/Akt (Shukla, Shukla, MacLennan, Fu, & Gupta, 2009). Outro gene localizado neste cromossoma é o *Retinoblastoma (Rb)*, no entanto as evidências da sua ação no AP são reduzidas, à exceção de um estudo sobre tumores neuroendócrinos de pequenas células da próstata, que demonstrou que a sua perda ocorria em 90% dos tumores (Tan *et al.*, 2014).

No 16q está localizado o gene da *E-caderina* (16q22.1) cuja expressão está reduzida em tumores da próstata, principalmente se pouco diferenciados. A sua expressão está inversamente correlacionada com o grau, estadiamento, metástases, recorrência e sobrevivência ao fim de 5 anos (Bostwick *et al.*, 2004).

Seguindo o esquema proposto por Nelson e colaboradores (2014) para a patogénese molecular dos AP, verificamos que ganhos no cromossoma 7 e cromossoma X antecedem a metastização. Neste último, o gene afetado pela amplificação é o *AR* que será posteriormente descrito de forma mais detalhada. No cromossoma 7q observa-se que, para além de amplificações, podem ocorrer perdas e translocações (7q21-q31), mas estas são menos frequentes (Bostwick *et al.*, 2004). A sobre-expressão da região 7q31 está associada ao desenvolvimento/progressão dos tumores da próstata (Bostwick *et al.*, 2004). O gene *EZH2* (7q35-q36), que codifica uma N-metiltransferase histona-lisina, apresenta-se amplificado nos AP mais avançados, em particular nos androgénio-independentes (W. G. Nelson *et al.*, 2014; Saramäki, Tammela, Martikainen, Vessella, & Visakorpi, 2006).

A capacidade da p53 regular o ciclo celular de forma a garantir que células com erros não proliferem, tornou-o conhecido por “guardião do genoma”. No entanto, mutações neste gene alteram a capacidade de resposta das células aos danos, levando

a instabilidade genética e desenvolvimento de novas mutações. Nos AP, o *p53* está associado a tumores mais agressivos e com maior risco de recidiva mesmo após prostatectomia radical (Schlomm *et al.*, 2008). O *p53* influencia também a resposta das células a terapias inibidoras da ação dos androgénios, Cronauer e colaboradores (2004) comprovaram que, em situações normais, o *p53* diminui a atividade dos androgénios, estabilizando a estimulação do AR. Com a progressão da doença este equilíbrio é alterado devido à acumulação de mutações, tanto no *p53* como no AR, o que torna os AP independentes de androgénio (Cronauer *et al.*, 2004). Nos estádios mais avançados, as mutações no *p53* tornam as células mais resistentes a tratamentos de quimioterapia e radioterapia, por incapacidade destas entrarem em apoptose ou em senescência (Chappell *et al.*, 2012).

A metastização dos AP marca o ponto sem retorno na progressão da doença, pois a existência de metástases bem como a independência do estímulo de androgénios para o crescimento celular torna os AP fatais. A variabilidade de mutações nas metástases de um mesmo caso reflete a grande instabilidade genómica e epigenómica destes tumores. As alterações de hipermetilação do DNA mantêm-se nas lesões metastáticas (W. G. Nelson *et al.*, 2014). Tal como é referido por Nelson e colaboradores (2014), o maior problema que surge com a heterogeneidade genética, epigenética e fenotípica dos AP é a capacidade destes tumores desenvolverem resistência aos tratamentos, independentemente do agente terapêutico usado.

O tratamento dos AP metastizados é efetuado através da ablação terapêutica dos androgénios e/ou em combinação com antiandrogénios (W. G. Nelson *et al.*, 2014). No entanto, verifica-se que, decorrido algum tempo, há uma seleção de células malignas androgénio-independentes que não responderam à terapêutica e que proliferam tornando a situação fatal (W. G. Nelson *et al.*, 2014). Estas células mantêm a expressão do recetor de androgénio bem como a sua via de sinalização intactas, mesmo na ausência de androgénios.

Diversas alterações no gene AR têm sido descritas em especial nestes casos de independência dos androgénios. A amplificação do gene AR, com consequente aumento da expressão do AR, parece estimular o crescimento de células independentes de androgénios através do aumento da sensibilidade das células tumorais para os baixos níveis de hormona (Saraon, Jarvi, & Diamandis, 2011). A ocorrência de mutações no gene AR que modificam a especificidade do recetor para o ligando, por exemplo a mutação *missense* do codão 877 com a substituição de treonina por alanina,

permite que hormonas como a progesterona ou o estrogénio e mesmo terapêuticas antiandrogénicas possam ativar a proteína recetor e iniciar a cascata de sinalização subsequente (Saraon *et al.*, 2011).

Outras formas de ativação do AR são as modificações pós-traducionais do recetor, a alteração das concentrações de proteínas coativadoras e correpessoras do AR, que vão promover ou inibir a expressão de genes regulados pelos androgénios e a utilização de vias de sinalização independentes dos androgénios, como as ativadas por fatores de crescimento, como o IGF-1 ou o *Epidermal Growth Factor* (EGF) ou por citocinas (Saraon *et al.*, 2011).

1.5. Biomarcadores do Adenocarcinoma da Próstata

Atualmente o principal biomarcador para detetar o AP é o PSA e é feita pela medição dos níveis de PSA no sangue. No entanto, o aumento do nível de PSA no sangue não é tão específico como seria desejável, pois mesmo em situações benignas, como prostatite ou HBP, verifica-se um aumento deste nível.

1.5.1. Biomarcadores no Sangue e na Urina

O uso do PSA, como biomarcador de rastreio do AP, levou a uma deteção mais precoce de muitos AP, com consequente diminuição do estadió da doença, nomeadamente no que respeita aos casos confinados à próstata (Abouassaly *et al.*, 2012).

Um estudo efetuado pela *European Randomized study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC), com 184.000 homens e com idades compreendidas entre os 55 e 69 anos, onde um grupo realizava análise ao PSA e outro não, demonstrou haver uma redução na mortalidade associada ao AP nos que realizaram a análise. Contudo, o número de testes de rastreio necessários e o número de indivíduos tratados é relativamente alto para que haja uma efetiva redução da taxa de mortalidade (ERSPC, n.d.). Desta forma, não se justifica a realização de um rastreio populacional organizado.

No entanto, as recomendações da *American Urological Association* (AUA) e da *European Association of Urology* (EAU) continuam a ser no sentido de ser feito um rastreio a indivíduos assintomáticos com mais de 40 anos. A EAU recomenda a

realização de um teste de PSA aos 40 anos, para determinar qual o intervalo de tempo para a realização do teste de rastreio – por exemplo, para homens com níveis de PSA inferiores a 1 ng/ml este pode ser realizado a cada 8 anos (Heidenreich *et al.*, 2012).

Os níveis de PSA podem ser utilizados para prever, a longo prazo, o risco de desenvolver AP, pois nos casos em que os níveis antes dos 60 anos se situem acima do intervalo 0,7 a 0,9 ng/ml, existe uma maior probabilidade de terem AP e que este seja de um grau mais elevado e com maior risco de progressão após tratamento (Huang, Campbell, & Goldenberg, 2014).

O PSA é também utilizado para avaliar a resposta terapêutica dos pacientes com estadios mais avançados, em particular nos que fazem tratamento de bloqueio hormonal (Huang *et al.*, 2014).

Um biomarcador atualmente utilizado, ainda que não em larga escala, é o PCA3, um RNA não codificante longo (lncRNA) que está aumentado em mais de 90% dos casos de AP, mas não em situações benignas (Heidenreich *et al.*, 2012; Prensner, Rubin, Wei, & Chinnaiyan, 2012). A sua elevada especificidade e sensibilidade ao nível tecidual, levou ao desenvolvimento de formas de deteção deste RNA em amostras de urina. Este biomarcador tem sido usado em combinação com a análise habitual de PSA, sendo especialmente importante em casos com biópsia prévia negativa (Prensner *et al.*, 2012).

Um outro biomarcador que utilizado em conjunto com a deteção de PCA3 melhora a sensibilidade de qualquer um destes testes isolados, é a deteção do mRNA do gene *TMPRSS2-ERG*. Este apenas é detetado no sangue de cerca de 50% dos casos de doentes com AP (Prensner *et al.*, 2012).

A utilização do PCA3 e do *TMPRSS2-ERG* tem o objetivo de melhorar a performance da deteção do PSA sérico, pois níveis elevados de *TMPRSS2-ERG* em doentes com PSA elevado representam tumores mais agressivos (Tomlins *et al.*, 2011). O uso destes biomarcadores detetáveis na urina permite uma melhor identificação de grupos de risco, de AP de alto risco e ainda de deteção de cancro em biópsia (Tomlins *et al.*, 2011).

Ao nível do *follow-up* do AP, a deteção de células neoplásicas no sangue parece ser uma das ferramentas a explorar, com o objetivo de melhorar a capacidade de previsão da resposta terapêutica dos doentes (Dijkstra, Mulders, & Schalken, 2014).

Um tipo de marcadores moleculares que têm sido estudados são os miRNAs derivados de células neoplásicas e, no caso específico do adenocarcinoma prostático,

que possam ser detetados no sangue e na urina. Existem dois tipos de miRNAs detetados nos estudos realizados com células de AP, o miRNA-141 e o miRNA-375 (L. Li, Hsieh, Ruggero, Greene, & Carroll, 2015). O miRNA-141 está sobre-expresso nos AP e permite, de forma sensível e específica, identificar pacientes com e sem tumor (Mitchell *et al.*, 2008), e prever a progressão da doença (Gonzales *et al.*, 2011), pois está presente em maior quantidade no sêrum dos doentes com neoplasias de alto grau (Brase *et al.*, 2011). O miRNA-375 mostrou ser um bom marcador de doença metastática com envolvimento ganglionar, no entanto não permite uma classificação tão correta do grau do tumor primário (Brase *et al.*, 2011). O miRNA-375 é também mais expresso nas células neoplásicas da próstata do que no tecido epitelial normal (Brase *et al.*, 2011).

1.5.2. Marcadores Imunocitoquímicos

A próstata tem alguns marcadores de imunocitoquímica (ICQ) importantes para o diagnóstico de patologias benignas e malignas. Os principais marcadores prostáticos são, tal como no sangue, a PSA e a PAP, muito utilizados para determinar a origem de um tumor ou metástase. No entanto, estes não permitem a diferenciação entre uma patologia benigna e maligna (Ro *et al.*, 2013). O PSA é um marcador útil na identificação de tumores pouco diferenciados (em particular quando estes têm localização próxima ao reto ou à bexiga). A intensidade de marcação ICQ do PSA pode variar no mesmo tumor de área para área e esta é, usualmente, mais forte em tumores de baixo grau do que nos de alto grau (Bostwick *et al.*, 2014).

As células secretoras da próstata apresentam marcação ICQ para a PSA e PAP (A e B da Figura 19), bem como para citoqueratinas de baixa massa molecular e vimentina (Rosai, 2011). As células basais que formam camada única que separam as células secretoras da membrana basal, apresentam marcação ICQ para citoqueratinas de alta massa molecular, nomeadamente citoqueratina 34βE12, citoqueratina 14 e citoqueratina 5/6, bem como para a proteína p63. Estes marcadores são importantes no diagnóstico diferencial de situações malignas bem diferenciadas, onde existe perda da integridade da membrana basal, e situações benignas (Ro *et al.*, 2013; Rosai, 2011). Destacam-se, como altamente específicas para as células basais, a citoqueratina 34βE12 e a proteína p63 (C e D da Figura 19) e são negativas nas zonas tumorais (Ro *et al.*, 2013).

As células neuroendócrinas presentes na glândula prostática têm marcação pelos anticorpos anti-cromogranina, anti-somatostatina e anti-calcitonina, entre outros. Estas células também co-expressam PSA (Rosai, 2011).

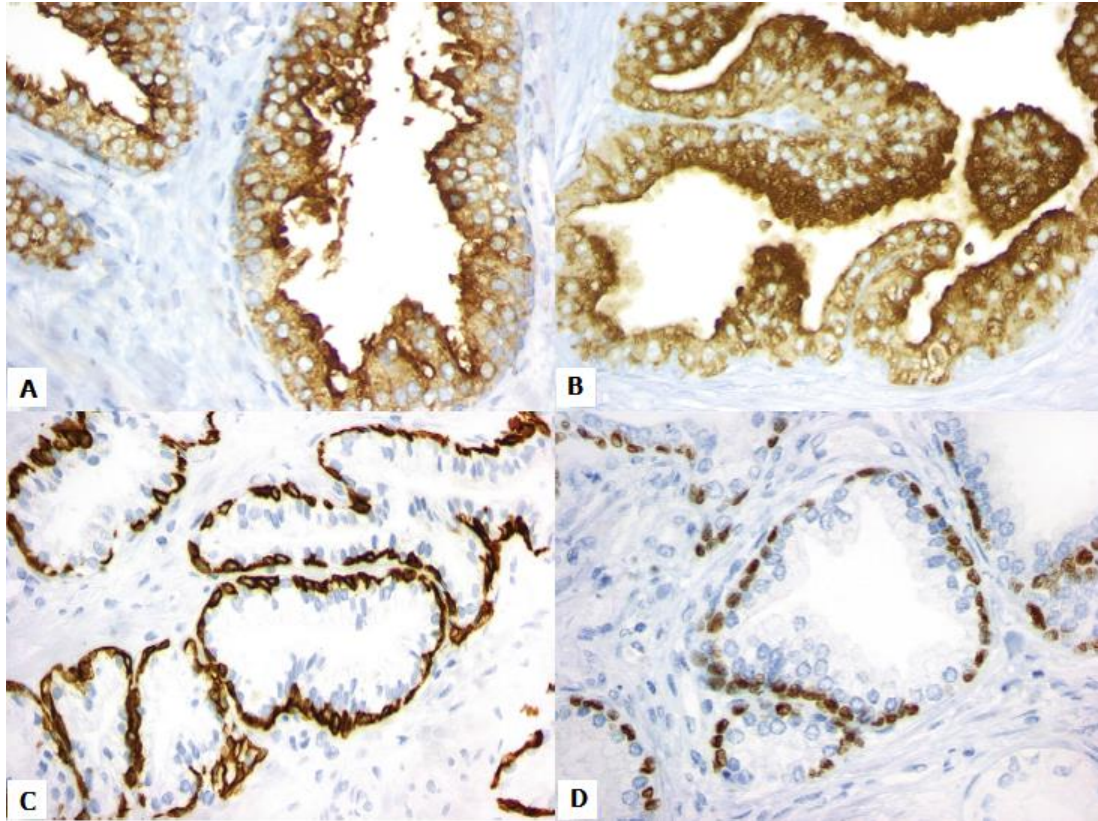


Figura 19 – Marcação imunocitoquímica em tecido prostático normal. A: Células secretoras positivas para anticorpo anti-PSA; B: Células secretoras positivas para anticorpo anti-PAP; C: Células basais positivas para anticorpo anti-citoqueratina 34βE12 (marcação citoplasmática); D: Células basais positivas para anticorpo anti-p63 (marcação nuclear) (retirada de Zhou *et al.*, 2012).

1.6. Antígeno Específico da Próstata (PSA)

Como foi referido anteriormente, o PSA é uma proteína utilizada como biomarcador do AP, quer no rastreio quer no controlo da eficácia da terapia.

1.6.1. Gene *KLK3* ou *PSA*

O gene *Kallikrein-related peptidase 3* (*KLK3*), mais conhecido por *PSA*, localiza-se em 19q13.41 (Weizmann Institute of Science, 2013), num *cluster* de genes designados por subfamília de *Kallikrein* que tem um tamanho aproximado de 300 kb.

O gene *KLK3* é constituído por 5850 pares de base e possui cinco exões, tal como os outros genes desta subfamília (Figura 20). A homologia entre estes genes varia entre 40% e 80%, sendo o tamanho dos cinco exões semelhante, ao contrário da componente intrónica que é variável (Balk, Ko, & Bublely, 2003; Borgoño & Diamandis, 2004). A posição dos codões que codificam para resíduos de aminoácidos no centro ativo é altamente conservada, como podemos observar esquematicamente na Figura 20. O codão que codifica para a histidina localiza-se próximo do final do exão 2, o codão que codifica para o ácido aspártico localiza-se no meio do exão 3 e o codão que codifica para a serina junto à extremidade 5' do exão 5 (Borgoño & Diamandis, 2004).

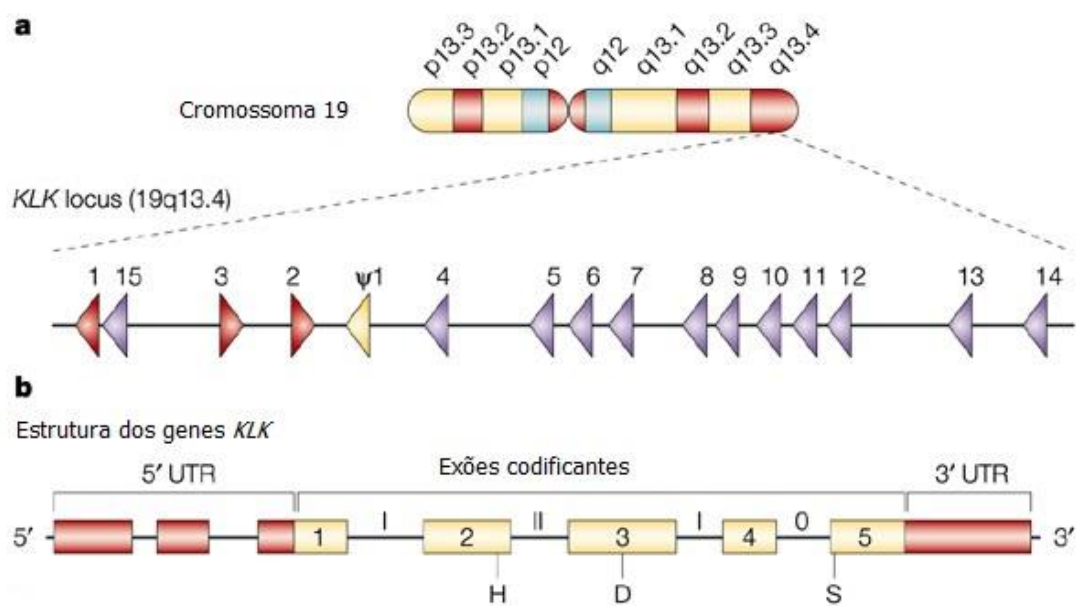


Figura 20 – Família de genes *KLK*. **a**: localização citogenética no cromossoma 19q13.4 e sua distribuição no *locus*; **b**: estrutura dos genes *KLK*, com cinco exões (1 a 5), quatro intrões de tamanho variável e identificação dos três aminoácidos, pertencentes ao centro ativo da proteína, que são muito conservados: histidina (H), ácido aspártico (D) e serina (S) (adaptada de Borgoño & Diamandis, 2004).

O gene *KLK3* é positivamente regulado por AR que é um recetor de hormonas esteroides, principalmente androgénio e DHT, que se liga como um homodímero a sequências *consensus* de DNA, denominadas de elementos de resposta aos androgénios (ARE). Estes AREs consistem em repetições de sequências palindrómicas de seis nucleótidos separados por três nucleótidos – GGTACAnnnTGTTCT (C. C. Nelson *et al.*, 1999). No gene *KLK3* existem três elementos de resposta aos androgénios – ARE-I, II e III (Figura 21). O ARE-I localiza-se entre a posição -170 e

a -156, o ARE-II entre a posição -400 e a -365 na região promotora do gene *KLK3*, e o ARE-III, que é um *enhancer* a montante, localiza-se entre a posição -4366 e a -3870 (Cleutjens *et al.*, 1997; Schuur *et al.*, 1996). Este último ARE-III parece ser fundamental para que a ligação do AR promova uma maior expressão do gene *KLK3*. Este facto pode ser explicado pela deformação da cadeia de DNA aquando da ligação do AR ao ARE-III, o que permite a interação direta ou indireta de outros fatores de transcrição e a região promotora do gene (Cleutjens *et al.*, 1997).

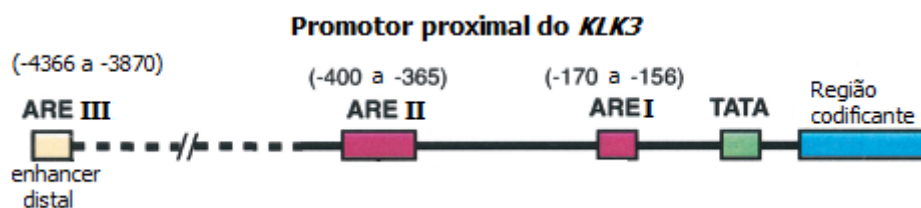


Figura 21 – Região promotora do gene *KLK3*, com duas regiões ARE (I e II) proximais e um *enhancer* distal (ARE-III) (adaptada de Balk *et al.*, 2003).

1.6.2. Proteína PSA

O gene *KLK3* (*PSA*) codifica para uma protease serina que hidrolisa as proteínas semenogelina-1, semenogelina-2 e fibronectina, com a função de liquefação do sêmen. É principalmente produzida pelas células secretoras da próstata. Esta proteína é constituída por 261 resíduos de aminoácidos e tem, aproximadamente, 29 kDa (UniProtKB/Swiss-Prot, n.d.). A expressão da PSA é regulada pelos androgénios e detetada no sangue a partir da puberdade. Os níveis de PSA aumentam com a idade e com o volume prostático (W. G. Nelson *et al.*, 2014).

A proteína PSA é sintetizada como preproPSA (Figura 22), que contém uma sequência sinalizadora na N-terminal de 17 resíduos de aminoácidos, que marca a proteína para o retículo endoplasmático de forma a ser posteriormente secretada (Borgño & Diamandis, 2004). Os aminoácidos são depois clivados, originando a forma inativa da proteína (proPSA) com 244 resíduos de aminoácidos (Balk *et al.*, 2003). O PSA é ativado por ação da proteína KLK2 através da clivagem dos sete aminoácidos N-terminal, e ocorre entre a arginina da posição 7 e a isoleucina da posição 8 ficando com 237 resíduos de aminoácidos (Balk *et al.*, 2003).



Figura 22 – Formação de PSA na sua forma ativa (adaptado de Balk *et al.*, 2003).

A sua inativação deve-se à elevada concentração de iões de zinco. A concentração de PSA é regulada pelo pH do meio. Esta proteína é 100 vezes mais abundante no sêmen do que no sangue, sendo também mais ativa no sêmen pois a semenogelina-1 tem grande afinidade para os iões de zinco. A produção de PSA é controlada pelos androgénios circulantes no sangue e os seus efeitos nas células mediados pelos recetores de androgénios através dos seus recetores (Bostwick *et al.*, 2014).

O PSA sérico pode apresentar-se elevado, de forma mais ou menos transitória, devido a várias situações: cancro, prostatite, PIN, retenção urinária aguda, insuficiência renal ou trauma (biopsia ou resseção transuretral, por exemplo) (Rosai, 2011).

No tecido prostático normal o PSA é excretado para o lúmen das glândulas sob a forma de proPSA, sendo posteriormente ativado pela proteína KLK2. O PSA no lúmen glandular sofre proteólise e assume uma forma inativa que pode entrar na circulação sanguínea sob a forma de PSA livre. Uma pequena fração do PSA ativado nas glândulas é difundido para a circulação sanguínea, onde é inativado por inibidores de protease, principalmente alfa-1 anti-quimiotripsina (ACT) (Balk *et al.*, 2003). O PSA livre corresponde entre 5% a 35% do PSA total no soro sanguíneo e o restante encontra-se ligado a inibidores de protease – PSA complexo (Romero Otero, Garcia Gomez, Campos Juanatey, & Touijer, 2014). No sangue é possível detetar um tipo de PSA, denominado de PSA benigno (bPSA), que é uma forma truncada do PSA livre/ativo e que é preferencialmente encontrado na HBP (W. G. Nelson *et al.*, 2014).

No AP, o aumento do PSA no sangue deve-se, segundo Balk e colaboradores (2003), à perda da integridade da membrana basal e da arquitetura do tecido. Estas alterações resultam na diminuição do PSA (proPSA e PSA inativo) no lúmen glandular, na difusão deste no parênquima prostático até atingir o sangue com o consequente aumento dos níveis de PSA, principalmente na forma de PSA complexo (W. G. Nelson *et al.*, 2014). Nos casos de neoplasia prostática observa-se, também, a presença de formas truncadas de PSA com resíduos de aminoácidos extra na extremidade N-terminal do proPSA, que alteram os locais de clivagem por parte da tripsina e da KLK2.

A proteína PSA tem ação mitogénica na proliferação tumoral atuando na clivagem da IGBFP-3, com consequente libertação do IGF-I, agente mitogénico das células estromais e epiteliais da próstata (Hassan, Kumar, Singh, & Yadav, 2007). O PSA também pode ativar o *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) fazendo com que as células tumorais se soltem e espalhem (Hassan *et al.*, 2007). A função enzimática do PSA pode contribuir para a rutura da membrana basal do epitélio prostático, facilitando a invasão tumoral e a metastização (Cheng *et al.*, 2006).

Os valores de referência variam com a idade (Tabela 2), sendo considerado que abaixo de valor total de 2 ng/ml a probabilidade do homem ter AP assintomático é baixa. De igual forma perante um valor de PSA acima de 10 ng/ml, o risco de existir um AP é elevado, pelo que a realização de biopsia é recomendada (Mayo Clinic, n.d.). No entanto, a pouca especificidade (podem existir níveis altos em situações benignas) e os intervalos de referência relativamente grandes, tornam mais complicada a decisão terapêutica/diagnóstica pois implica a realização de intervenções mais ou menos invasivas.

Tabela 2 – Valores de referência do PSA total em função da idade (retirada de Mayo Clinic, n.d.).

Idade (anos)	Valores de PSA total (ng/ml)
< 40	$\leq 2,0$
40 – 49	$\leq 2,5$
50 – 59	$\leq 3,5$
60 – 69	$\leq 4,5$
70 – 79	$\leq 6,5$
≥ 80	$\leq 7,2$

1.6.3. Polimorfismo ARE-I do gene *KLK3*

Na região promotora do gene *KLK3*, mais exatamente no elemento de resposta aos androgénios I (ARE-I) deste gene (Figura 21), foi identificado um polimorfismo na posição -158 que é designado por rs266882 (NCBI, n.d.-a). Nesta posição há a substituição de uma guanina (G), alelo ancestral, por uma adenina (A). A frequência dos alelos mostrou ser variável de estudo para estudo. O genótipo mais observado em caucasianos, hispânicos, afro-americanos e árabes é o genótipo heterozigótico AG (Chiang, Chen, Chang, & Hong, 2004; Jesser *et al.*, 2008; Kalay *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2007; Liu, Zhang, Young, & Kao, 2003; Medeiros *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2003; Salinas, Austin, Ostrander, & Stanford, 2005; Samzadeh *et al.*, 2012; Schatzl *et al.*, 2005; Severi *et al.*, 2006; Sieh *et al.*, 2006; Sivoňová *et al.*, 2012; Song, Park, & Lee, 2013; Soni *et al.*, 2012; W. M. Xue *et al.*, 2001; W. Xue *et al.*, 2000). Nos estudos com indivíduos asiáticos o genótipo GG foi o mais observado por oposição ao genótipo AA (Chiang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2003; Shibahara *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003; W. M. Xue *et al.*, 2001). No único estudo realizado com população portuguesa, a distribuição dos genótipos é: 44,9% AG, 30,7% AA e 25,2% GG (Medeiros *et al.*, 2002).

Este Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP) foi associado aos níveis séricos de PSA por Xue e colaboradores (2001), com níveis mais elevados de PSA associados a um genótipo AA. No entanto, no estudo *in vitro* e *in vivo* realizado por Rao e colaboradores (2003), cuja única alteração foi o nucleótido -158 do gene *KLK3*, não se verificaram diferenças significativas na atividade do promotor, ou seja, nos níveis de PSA. Por outro lado, o genótipo AA mostrou associação com níveis mais altos de PSA sérico em indivíduos saudáveis, quando comparado com os outros genótipos (W. M. Xue *et al.*, 2001). Resultados semelhantes verificaram-se também nos estudos de Salinas e colaboradores (2005), e Song e colaboradores (2013), com o primeiro a encontrar relação entre o SNP rs266882 e os níveis de PSA em indivíduos saudáveis e o segundo a encontrar relação entre os genótipos AA e AG e níveis de PSA mais elevados.

Diversos estudos têm sido publicados no sentido de demonstrar a associação deste SNP e o AP com resultados contraditórios. No único estudo com indivíduos portugueses, realizado por Medeiros e colaboradores (2002), foi observado um número significativo de homens com AP e idade inferior a 67 anos com alelo A

comparativamente a homens saudáveis. Neste mesmo estudo, verificou-se a existência de uma relação estatisticamente significativa entre o genótipo AA e o desenvolvimento de AP antes dos 67 anos, bem como a existência de níveis de PSA no sangue mais elevados.

Gsur e colaboradores (2002) concluíram que a presença do alelo G tem efeito protetor no que respeita ao risco de desenvolver AP, comparativamente com os indivíduos com genótipo AA. Contudo, neste estudo concluíram que o genótipo GG é mais frequente em pacientes com *score* de Gleason superior ou igual a 7.

No estudo de Lai e colaboradores (2007) foi demonstrado um risco três vezes superior de desenvolver AP na presença do alelo A na população caucasiana australiana. Anteriormente, Severi e colaboradores (2006) não encontraram qualquer relação entre o risco de desenvolver AP e qualquer dos genótipos deste polimorfismo. Verificaram, no entanto, uma relação estatisticamente significativa entre o genótipo GG e estadios mais avançados de AP.

Em dois estudos com homens japoneses (Shibahara *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003) não foi verificada qualquer associação entre o SNP rs266882 e o risco de desenvolver AP, nem com os níveis séricos de PSA (exceto num reduzido número de pacientes com AP metastático) ou outros parâmetros, tais como o grau de tumor, o estadiamento tumoral ou o volume ocupado pelo cancro.

Cicek e colaboradores (2005) compararam diferentes polimorfismos do gene *KLK3* com o risco de desenvolver AP e a sua agressividade, concluindo que o SNP rs266882, mais exatamente o genótipo GG, possui uma relação estatisticamente significativa com o desenvolvimento de AP. Uma conclusão semelhante foi obtida por Kalay e colaboradores (2009) que observaram um risco duas vezes maior de desenvolver AP com *score* de Gleason mais alto na presença de um alelo G, bem como níveis de PSA mais elevados, ainda que este aumento não fosse estatisticamente significativo.

Num estudo que avaliou os efeitos do polimorfismo de repetição do gene *AR* e do polimorfismo ARE-I no cancro da próstata numa população turca, não se observou qualquer diferença entre o polimorfismo do ARE-I e os grupos estudados – controlo, HBP e AP (Alptekin *et al.*, 2012). Idêntica situação foi verificada por Salinas e colaboradores (2005) que efetuaram um estudo com o objetivo de estabelecer uma relação entre os mesmos polimorfismos e o risco de desenvolver AP, tendo apenas verificado associação estatisticamente significativa entre o genótipo AA e níveis mais

elevados de PSA, em indivíduos com PSA inferior a 4 ng/ml. No entanto, Kuasne e colaboradores (2010), num estudo sobre os mesmos polimorfismos, verificaram existir associação entre o genótipo GG e o risco de desenvolver AP, bem como de AP ter um *score* de Gleason igual ou superior a 7. Contudo, os níveis de PSA não apresentaram relação com o polimorfismo do gene *KLK3*.

No estudo de Cramer e colaboradores (2008), o SNP rs266882 não mostrou qualquer associação com *score* de Gleason, volume do tumor ou peso da próstata. Contudo, foi determinada a existência de uma relação estatisticamente significativa entre este alelo e a presença de metástases ganglionares. No mesmo estudo os autores tentaram relacionar os níveis de PSA sérico e a recorrência da doença ao fim de cinco anos com polimorfismo ARE-I -158, havendo uma associação fraca do polimorfismo aos níveis de PSA, com o alelo A associado a níveis mais baixos de PSA, e não se verificou associação estatística para recorrência da doença. Dados semelhantes foram verificados no estudo de Lai e colaboradores (2007), onde não se verificou qualquer associação do polimorfismo e os níveis de PSA ou restantes aspetos analisados também por Cramer e colaboradores (2008).

O polimorfismo ARE-I do gene *KLK3* parece alterar a afinidade do recetor de androgénio para este local, sendo que o alelo A apresenta maior afinidade e estabilidade de ligação do elemento de resposta aos androgénios (Lai *et al.*, 2007). Estudos *in silico* representando a ligação entre o domínio de ligação do AR e os dois alelos para a posição -158 do gene *KLK3*, demonstraram a existência de mais duas pontes de hidrogénio com o alelo A, ainda que estas ocorram na posição -160, o que parece indicar que alteração do alelo na posição -158 modifica a conformação do local de ligação (Lai *et al.*, 2007).

É de salientar que Lai e colaboradores (2007) não encontraram relação entre o SNP rs266882 e o *score* de Gleason, ou o estadiamento TNM.

Um estudo com homens iranianos demonstrou a existência de um risco mais elevado de desenvolver AP nos indivíduos com genótipo GG do SNP rs266882 quando comparado com o genótipo AG (Samzadeh *et al.*, 2012). Tal como em outros estudos referidos anteriormente, não foi verificada qualquer relação entre o grau e estadiamento tumoral, idade de diagnóstico, níveis de PSA sérico e o risco de desenvolver AP.

Noutro estudo do ano de 2012, com homens originários do norte da Índia, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre os genótipos AG e AA

e o risco de desenvolver AP e HBP. Já os níveis séricos de PSA não foram relacionados com qualquer genótipo (Soni *et al.*, 2012).

A Tabela 3 sintetiza as principais conclusões encontradas na literatura sobre a associação entre o polimorfismo rs266882 e o risco de desenvolver AP e os níveis de PSA no sangue.

Tabela 3 – Principais estudos sobre o polimorfismo rs266882 e a sua associação ao risco de desenvolver AP e os níveis de PSA no sangue.

Referência	População	Principais conclusões
W. Xue <i>et al.</i> (2000)	Caucasiana e afro-americanos	GG aumenta o risco de AP mais avançado.
W. M. Xue <i>et al.</i> (2001)	Caucasiana, hispânica, afro-americanos e japoneses-americanos	AA associado a níveis mais elevados de PSA.
Gsur <i>et al.</i> (2002)	Caucasiana	Alelo G com efeito protetor do desenvolvimento de AP. Genótipo GG associado AP mais agressivos. SNP não associado aos níveis de PSA.
Medeiros <i>et al.</i> (2002)	Portuguesa	Alelo A associado ao risco de desenvolver AP. AA associado a níveis mais elevados de PSA.
Rao <i>et al.</i> (2003)	Caucasiana e afro-americanos	SNP não associado aos níveis de PSA.
Wang <i>et al.</i> (2003)	Japonesa	SNP não associado ao risco de desenvolver AP nem aos níveis de PSA.
Chiang <i>et al.</i> (2004)	Chinesa	Alelo G associado ao risco de desenvolver AP. GG associado a estádios mais avançados e maior volume de tumor.
Cicek <i>et al.</i> (2005)	Maioria Caucasiana	SNP associado a risco desenvolver AP menos agressivo.
Salinas <i>et al.</i> (2005)	Caucasiana	Alelo A associado a níveis de PSA. SNP não associado ao risco de desenvolver AP.

Schatzl <i>et al.</i> (2005)	Austríaca	GG associado a níveis mais elevados de PSA e <i>score</i> de Gleason mais elevado.
Severi <i>et al.</i> (2006)	Australiana	SNP não associado ao risco de desenvolver AP nem aos níveis de PSA.
Lai <i>et al.</i> (2007)	Caucasianos Australianos	AA e AG com maior risco de desenvolver AP. SNP não associado aos níveis de PSA.
Cramer <i>et al.</i> (2008)	Norte-americanos	Alelo A associado aos níveis de PSA mais baixos. Alelo A associado a menor invasão dos gânglios linfáticos.
Jesser <i>et al.</i> (2008)	Caucasiana	SNP não associado ao risco de desenvolver AP nem aos níveis de PSA.
Kalay <i>et al.</i> (2009)	Turca	Alelo G com maior risco de desenvolver AP com <i>score</i> Gleason mais elevado e a níveis mais elevados de PSA.
Sävblom <i>et al.</i> (2009)	Sueca	SNP não associado aos níveis de PSA.
Kuasne <i>et al.</i> (2010)	Caucasiana brasileira	SNP associado ao risco de desenvolver AP. SNP não associado aos níveis de PSA.
Soni <i>et al.</i> (2012)	Indiana	Alelo A associado ao risco de desenvolver AP.
Sivoňová <i>et al.</i> (2012)	Caucasiana	SNP não associado ao risco de desenvolver AP nem aos níveis de PSA.
Samzadeh <i>et al.</i> (2012)	Árabe	GG com maior risco de desenvolver AP. SNP não associado aos níveis de PSA.
Alptekin <i>et al.</i> (2012)	Turca	SNP não associado ao risco de desenvolver AP.
Song <i>et al.</i> (2013)	Coreana	SNP associado aos níveis de PSA no grupo controlo. SNP não associado ao risco de desenvolver AP.

A possível associação entre o polimorfismo rs266882 e o desenvolvimento de AP tem sido amplamente estudada e, mesmo com resultados contraditórios, o conhecimento nesta área é enriquecido.

1.7. Objetivos

O adenocarcinoma da próstata é, como foi referido anteriormente, o segundo tumor mais frequente no homem a nível mundial, sendo o que tem maior incidência na Europa.

Este trabalho tem como objetivos principais:

- 1) Determinar a frequência dos genótipos para o SNP do ARE-I do gene *KLK3* em homens com AP e com HBP;
- 2) Associar os diferentes genótipos e o *score* de Gleason, os níveis de PSA, o T do estadiamento tumoral e o volume da próstata ocupado pelo tumor.

A existência de resultados contraditórios no que respeita à associação entre o rs266882 e o desenvolvimento de AP, torna este trabalho ainda mais relevante por contribuir para avaliar se na população em estudo existe esta associação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização da amostra

A população de estudo foram os homens da área de intervenção do Centro Hospitalar Barreiro Montijo (CHBM).

A amostra foi constituída por 70 peças de prostatectomia radical com diagnóstico histológico de adenocarcinoma da próstata (AP) e o grupo controlo por 39 peças de resseção prostática com diagnóstico histológico de hiperplasia benigna prostática (HBP) fixadas em formol.

Para a realização deste estudo foi pedida, previamente, autorização à Comissão Nacional de Proteção de Dados e, após o parecer favorável desta (Anexo 2), ao Conselho de Administração e ao Serviço de Anatomia Patológica do CHBM (Anexos 3 e 4).

2.2. Extração de DNA

Antes de realizar a extração de DNA, nos casos de adenocarcinoma da próstata, foram realizados cortes histológicos em lâmina de áreas com tumor e sem tumor. As lâminas foram coradas com a coloração de Hematoxilina e Eosina (Anexo 5) e após observação ao microscópio ótico foram delimitadas as áreas de interesse para a extração de DNA (Figura 23 e Figura 24). Nos casos do grupo de HBP não foi efetuada a coloração de Hematoxilina e Eosina, pois não foi necessário escolher nenhuma área específica.

Para cada caso efetuaram-se três cortes histológicos de 4 µm cada, que foram posteriormente colocados numa estufa a 75° C para adesão dos cortes às lâminas de vidro. Posteriormente os cortes histológicos foram desparafinados e secos ao ar.

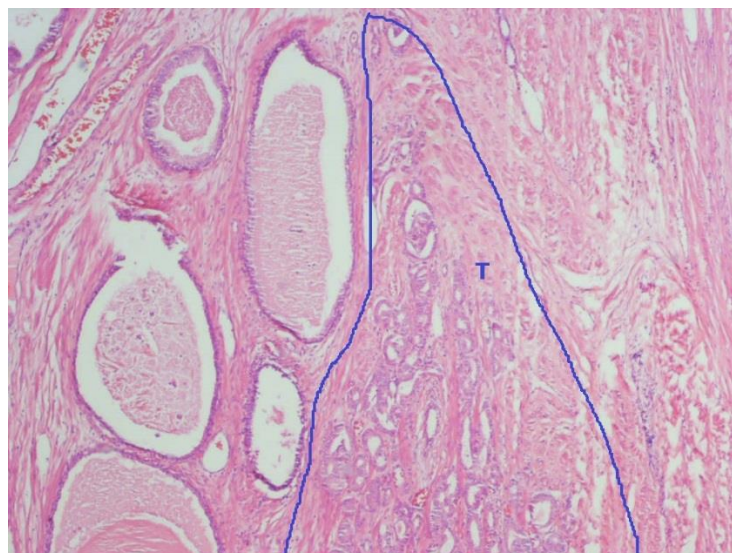


Figura 23 – Delimitação ao microscópio da área de interesse, neste caso da zona com tumor (T) – caso 140 (ampliação de 50x).

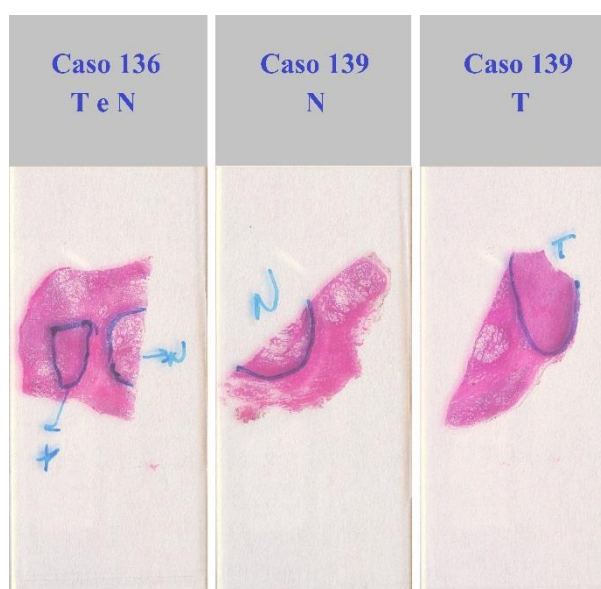


Figura 24 – Lâminas com delimitação das áreas de interesse (T: tumor; N: tecido normal).

As áreas de interesse em cada caso foram removidas com auxílio de uma agulha e 2 µl de solução de extração (10 µl de tampão de PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,8, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM KCl, 20 mM MgSO_4 , 1 mg/ml nuclease-free BSA, 1% (v/v) Triton X-100, *NZYTech*), 8 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e 352 µl de água ultra-pura), e colocadas em tubos de PCR de 0,2 ml com 20 µl de solução de extração. As amostras foram incubadas a 56° C durante 24 horas, seguido de 10 minutos a 95° C, no termociclador *Mastercycler personal* (*Eppendorf*).

Após este procedimento, foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente (*Centrifuge 5417C*, rotor *F45-30-11* (*Eppendorf*)). A fração solúvel contendo o DNA foi transferida para um novo tubo devidamente identificado e armazenado a -20° C.

Foram efetuadas eletroforeses em gel de agarose (*Seakem® LE Agarose – Lonza*) a 1% (p/v) em tampão 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA) com 6 µl *RedSafe* (20.000x) (*iNtRON®*) por 100 ml, para determinar a qualidade do DNA.

2.3. Análise do polimorfismo ARE-I do gene *KLK3*

2.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação exponencial de DNA, o que permite obter, num curto período de tempo e *in vitro*, grandes quantidades de um segmento específico de DNA (Nolte & Hill, 2011).

Durante a PCR são utilizadas temperaturas elevadas para desnaturar o DNA em duas cadeias simples, de forma a permitir a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), que são constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois *primers* complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nas suas regiões terminais 3'. Desta forma a DNA polimerase pode sintetizar a cadeia complementar, usando como molde o DNA de cadeia simples.

A reação de PCR necessita de outros componentes para funcionar além do DNA e dos *primers*: Taq polimerase (*Thermus aquaticus*, que é termorresistente mantendo a sua atividade a temperaturas elevadas); solução tampão (que garante a manutenção de pH ótimo para a atividade da enzima); desoxirribonucleótidos (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e iões magnésio Mg^{2+} (cofator enzimático necessário para o correto funcionamento da enzima e especificidade do ensaio).

A reação de PCR ocorre em ciclos que se repetem entre 30 a 40 vezes. Cada ciclo é composto por três fases: 1) desnaturação, 2) hibridação dos *primers* ou emparelhamento, e 3) extensão.

Durante a desnaturação a mistura de reação é aquecida a 94 – 96° C, o que leva à quebra das pontes de hidrogénio que unem as duas cadeias complementares do DNA.

Na fase de emparelhamento dos *primers*, estes ligam-se em locais específicos por complementaridade ao DNA-alvo e determinam os locais de início da reação. Esta fase ocorre a uma temperatura mais baixa (entre 55 a 70° C), a qual é determinada pela temperatura de fusão ou desnaturação dos *primers*.

A extensão é a última fase e corresponde à síntese da cadeia complementar da cadeia molde a partir do local onde se ligaram os *primers*. O processo é iniciado através da incorporação de dNTPs, de acordo com a sequência-alvo de DNA, pela Taq polimerase no sentido 5'-3' a uma temperatura próxima dos 72° C.

No final do primeiro ciclo formam-se duas novas cadeias de DNA com tamanhos diferentes. Quando ocorre o segundo ciclo, cada *primer* liga-se às cadeias que foram formadas, ou seja, após ocorrer a transcrição, mantém-se uma cadeia original (cadeia molde) e forma-se uma cadeia nova. E assim consegue-se selecionar exatamente onde começa e termina o fragmento de DNA pretendido e todos os fragmentos vão possuir o mesmo tamanho (número de pares de bases) no final da reação PCR.

2.3.2. Amplificação por PCR do polimorfismo ARE-I do gene *KLK3*

Para a análise do polimorfismo ARE-I do gene *KLK3* foram usados os *primers* apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – *Primers* utilizados para amplificação de segmento com 300 pb do gene *KLK3* (Kalay *et al.*, 2009).

<i>Primer</i>	Sequência	DNA alvo
ARE-I <i>Forward</i>	5' – TTG TAT GAA GAA TCG GGG ATC GT – 3'	Gene <i>KLK3</i>
ARE-I <i>Reverse</i>	5' – TCC CCC AGG AGC CCT ATA AAA – 3'	

Os PCR foram realizados usando tubos de PCR *illustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads™* (GE Healthcare Life Sciences), ao qual se adicionou 3 µl de DNA genómico, 1 µl de cada *primer* e 20 µl de água. As reações de PCR foram efetuadas nos termocicladores *MyCycler™* e *MJ Mini™ Gradient* (Bio-Rad), com as condições apresentadas na Tabela 5. Todos os PCR tiveram um volume de reação final de 25 µl. Como a análise do estudo era qualitativa não foi necessário quantificar o DNA antes de cada PCR.

Tabela 5 – Condições da reação de PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94° C	10 minutos	1x
Desnaturação	94° C	1 minuto	35x
Hibridação	59° C	1 minuto	
Extensão	72° C	40 segundos	
Extensão final	72° C	10 minutos	1x
-	4° C	∞	

Para controlo da eficiência das reações de PCR foram efetuadas eletroforeses em gel de agarose (*Seakem® LE Agarose – Lonza*) a 1% (p/v) em tampão TAE 1x com 6 µl *RedSafe* (20.000x) (*iNtRON®*) por 100 ml.

2.3.3. Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

Esta técnica consiste na análise de diferenças de comprimento, após restrição de sequências homólogas de DNA, através da deteção de fragmentos de diferentes tamanhos por eletroforese após hidrólise com enzimas de restrição específicas (NCBI, n.d.-b). A existência de alterações na cadeia de DNA (quer sejam mutações, deleções ou inserções), devem levar a enzima de restrição a reconhecer ou não determinadas sequências palindrómicas. As alterações na cadeia de DNA podem também alterar o número de sequências, originado polimorfismos de comprimento.

2.3.4. Restrição do fragmento do gene *KLK3*

As amostras amplificadas foram depois sujeitas a restrição enzimática com a enzima *NheI* (*NZYTech*), durante 2 horas a 37° C. As condições de restrição foram as seguintes para um volume final de 30 µl: 17 µl de água esterilizada, 2 µl de tampão da enzima, 10 µl de produto de PCR e 1 µl de enzima *NheI* 10000 U/ml (*NZYTech*).

Após a reação de restrição, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (*Seakem® LE Agarose – Lonza*) a 2% (p/v) em TAE 1x com 6 µl *RedSafe* (20.000x) (*iNtRON®*) por 100 ml. O padrão esperado é uma banda única com 300 pb que corresponde a genótipo A/A, uma banda única com 150 pb que traduz um genótipo

G/G e duas bandas com 300 pb e 150 pb que corresponde a genótipo de heterozigotia A/G.

2.4. Análise de resultados

Os resultados obtidos para variáveis pertinentes para o estudo como diagnóstico, idade, *score* de Gleason, T de estadiamento tumoral, níveis de PSA total, volume da próstata ocupado pelo AP, invasão perineural, invasão vascular, invasão da cápsula e genótipo identificado foram registados numa base de dados e processados pelo *software SPSS (IBM Corporation)* versão 22, sendo efetuada análise descritiva dos mesmos.

Para a determinação de associação entre o genótipo do polimorfismo rs266882 com as restantes variáveis recorreu-se ao Coeficiente de Contingência. Foi ainda utilizado o teste de Spearman para comparar os níveis de PSA total com outras variáveis ordinais. O nível de significância utilizado no estudo é de 0,05, salvo referência em contrário.

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

A amostra de estudo era constituída por um total de 109 casos que se dividiam em 70 casos de adenocarcinoma da próstata (tecido tumoral e tecido normal) e 39 de hiperplasia benigna prostática. A média de idade era de 67,8 anos, sendo a idade mínima de 48 anos e a máxima de 90 anos.

Os indivíduos com AP tinham idade compreendida entre os 48 e 80 anos, sendo a média de 66,2 anos. Como se observa no Gráfico 1, a faixa etária mais representada foi a dos 61 – 70 anos (62,9%), seguida da faixa dos 71 – 80 anos (22,6%). É de salientar que apenas houve três casos de AP em indivíduos com idade igual ou inferior a 50 anos (4,8%).

No grupo de homens com HBP a média de idades foi de 71,9 anos, variando entre os 56 e 90 anos. Tal como nos indivíduos com AP, as faixas etárias mais representadas foram dos 61 – 70 anos (48,7%) e 71 – 80 anos (38,5%).

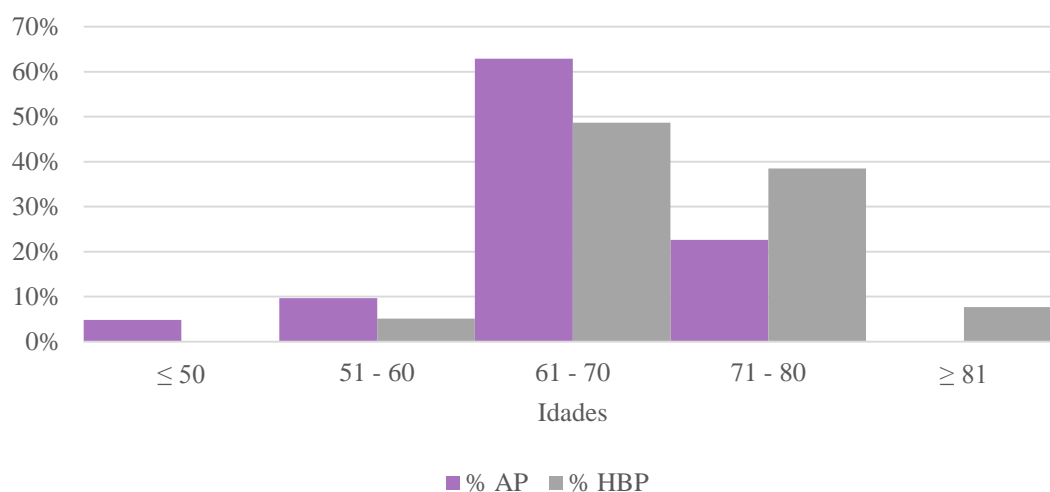


Gráfico 1 – Distribuição etária dos indivíduos com AP e HBP.

O *score* de Gleason, das amostras de AP, que mais vezes se verificou foi o 7, seguido do 6 que representam 52,9% e 41,4%, respectivamente (Gráfico 2). Os *scores* de 8 e 9 apenas representam 2,9% cada um, o que corresponde a 2 casos cada.

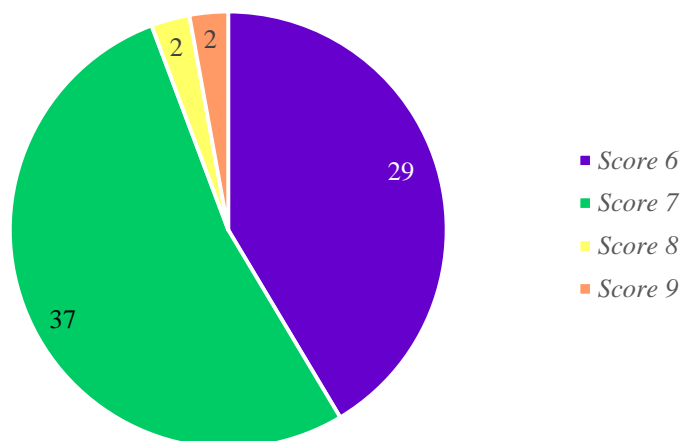


Gráfico 2 – Distribuição do *score* de Gleason dos indivíduos com AP.

Relativamente ao T do estadiamento tumoral, aquele que mais vezes se observou foi o T2c em 31 casos. O estadiamento igual ou superior a T3 representa 30% do total dos casos de AP (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição do T do estadiamento tumoral dos indivíduos com AP.

T – Estadiamento	Frequência	Percentagem (%)
2	4	5,7
2a	13	18,6
2b	1	1,4
2c	31	44,3
3	5	7,1
3a	9	12,9
3b	6	8,6
3c	1	1,4
Total	70	100,0

Os valores de PSA total dos indivíduos com AP (disponíveis para 67 dos 70 casos de AP) distribuem-se entre os 0,01 ng/ml e os 22,6 ng/ml, com o valor médio a ser 8,23 ng/ml. Da análise do Gráfico 3, podemos concluir que aproximadamente 50% dos valores se situaram no intervalo de 4 – 8 ng/ml (50,7%). Apenas 7,5% dos casos apresentou um valor igual ou inferior a 4 ng/ml, o que corresponde a cinco casos.

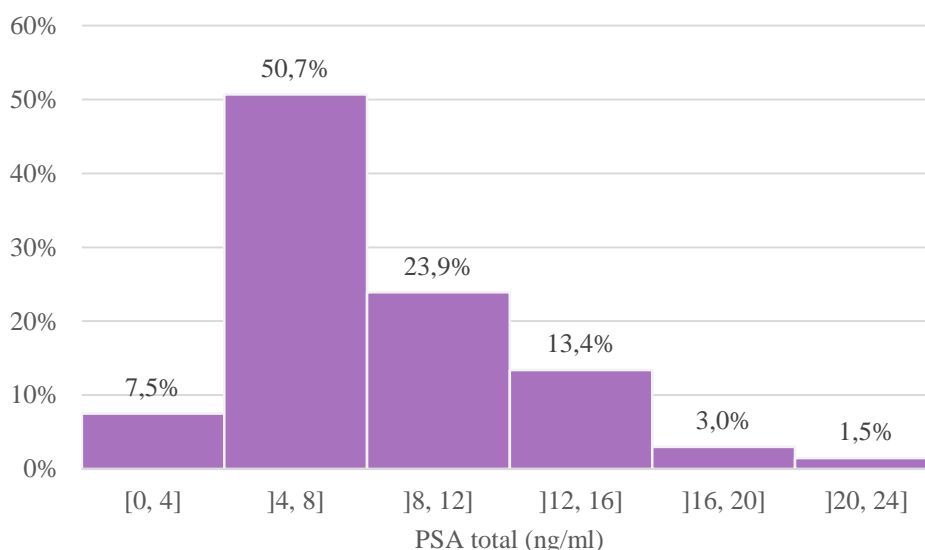


Gráfico 3 – Distribuição dos indivíduos com AP por níveis de PSA total.

O volume ocupado pelo tumor na próstata estava apenas disponível em 56 dos 70 casos de AP. No Gráfico 4 observa-se que a maioria dos casos disponíveis apresentou um volume de AP inferior a 30%. É ainda de salientar que 6 dos 56 casos tinham um volume de tumor superior a 60%.

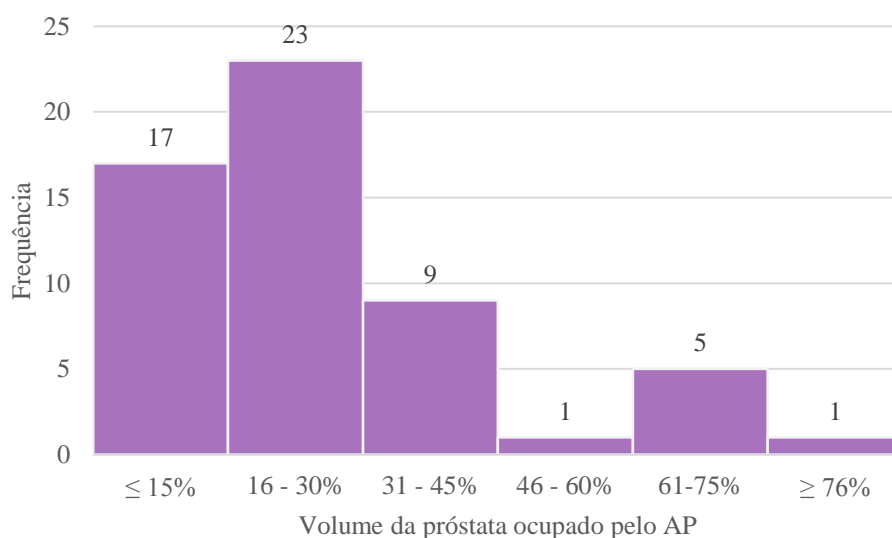


Gráfico 4 – Distribuição dos indivíduos com AP de acordo com o volume prostático ocupado por AP.

Ao nível da ocorrência de invasão vascular nos casos de AP, esta estava presente em apenas 4 dos 70 casos, a invasão perineural em 49 casos e a invasão da cápsula em 23 (Gráfico 5).

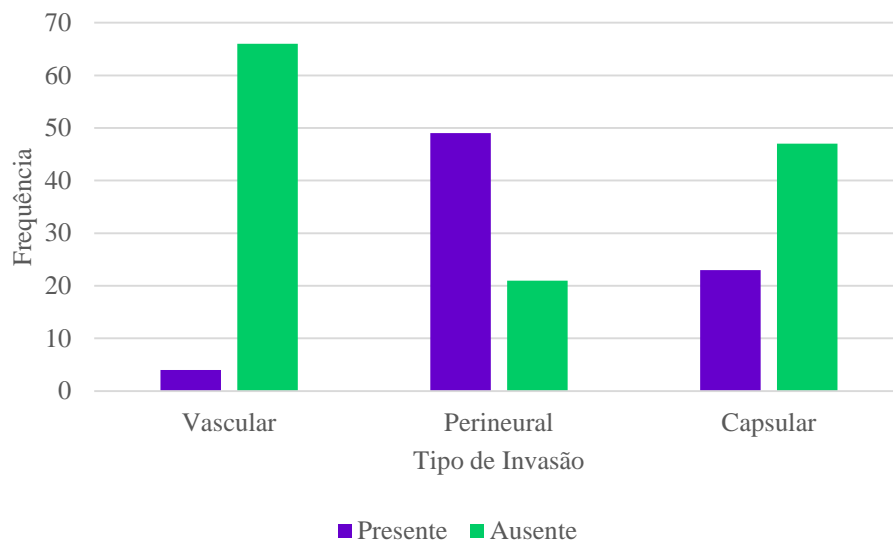


Gráfico 5 – Frequência da ocorrência de invasão vascular, perineural e capsular dos casos de AP.

3.2. Determinação do genótipo do polimorfismo ARE-I do gene *KLK3*

Após a extração do DNA das amostras, foi realizado PCR para amplificação do fragmento de DNA que inclui o polimorfismo rs266882 com o tamanho de 300 pb (Figura 25). Dos 70 casos com diagnóstico de AP obtiveram-se 66 amplificações e dos 39 casos de HBP obtiveram-se 36. A degradação do DNA ou a utilização de formol na fixação dos tecidos, que induz a formação de ligações cruzadas entre as proteínas, podem explicar a ausência de DNA em alguns dos casos.

O passo seguinte foi a restrição enzimática do DNA extraído com a enzima *NheI*.

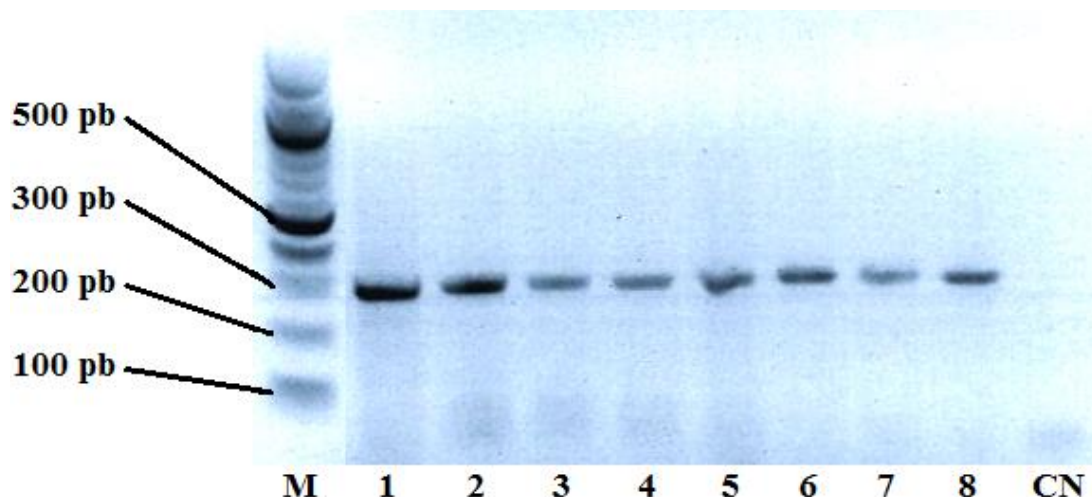


Figura 25 – Controlo da eficiência da reação de PCR do segmento de DNA com 300 pb que inclui o polimorfismo ARE-I por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v). Legenda: M – marcador de massa molecular de 100 pb (N3231S, *New England Biolabs*), 1 – caso 141 tecido tumoral, 2 – caso 141 tecido normal, 3 – caso 140 tecido tumoral, 4 – caso 140 tecido normal, 5 – caso 139 tecido tumoral, 6 – caso 139 tecido normal, 7 – caso 137 tecido tumoral, 8 – caso 137 tecido normal e CN – controlo negativo.

O perfil de bandas esperado para o polimorfismo em estudo é uma banda com 300 pb quando o genótipo é AA, uma banda com aproximadamente 150 pb quando o genótipo é GG e duas bandas quando o genótipo é heterozigótico AG (Figura 26). O produto das 102 (66 AP + 36 HBP) reações de restrição enzimática foi aplicado em gel de agarose, tendo-se obtido resultado em 62 amostras de AP e 34 amostras de HBP.

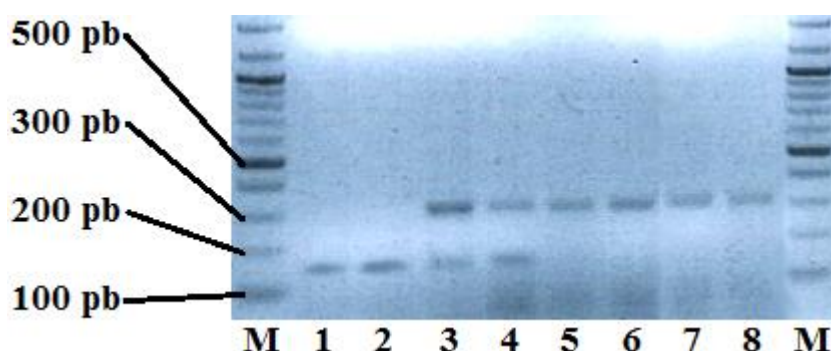


Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) dos produtos de restrição para determinação do genótipo do polimorfismo rs266882. Legenda: M – marcador de massa molecular de 100 pb (N3231S, *New England Biolabs*), 1 – caso 118 tecido tumoral, 2 – caso 118 tecido normal, 3 – caso 116 tecido tumoral, 4 – caso 116 tecido normal, 5 – caso 114 tecido tumoral, 6 – caso 114 tecido normal, 7 – caso 108 tecido tumoral, 8 – caso 108 tecido normal.

O genótipo mais observado em qualquer dos grupos foi o AA, seguido do AG e por último o GG como se apresenta na Tabela 7. Esta distribuição de frequências de genótipo está de acordo com o princípio de Hardy-Weinberg que estabelece que as mesmas permanecem constantes na população ($p\text{-value} = 0,119$). Os genótipos dos tecidos tumorais e normal foi idêntico em todos os casos de AP. A associação entre o genótipo e AP/HBP foi medida pelo coeficiente de contingência. O valor obtido para o coeficiente de contingência não é significativo ($p\text{-value} = 0,89$), o que constitui um forte indício de inexistência de associação entre estas variáveis.

Tabela 7 – Frequências dos genótipos do polimorfismo rs266882 de acordo com o diagnóstico.

Genótipo	AP	HBP	Total
AA	30 (48,4%)	18 (52,9%)	48 (50%)
AG	23 (37,1%)	12 (35,3%)	35 (36,5%)
GG	9 (14,5%)	4 (11,8%)	13 (13,5%)
Total	62	34	96

A distribuição do *score* de Gleason de acordo com o genótipo é apresentada no Gráfico 6, não existindo associação estatisticamente significativa entre as duas variáveis ($p\text{-value} = 0,414$). Considerando que os AP com *score* de Gleason igual ou superior a 7 são considerados mais agressivos, também se verificou não existir associação estatística entre o genótipo e os *scores* de Gleason mais altos ($p\text{-value} = 0,857$).

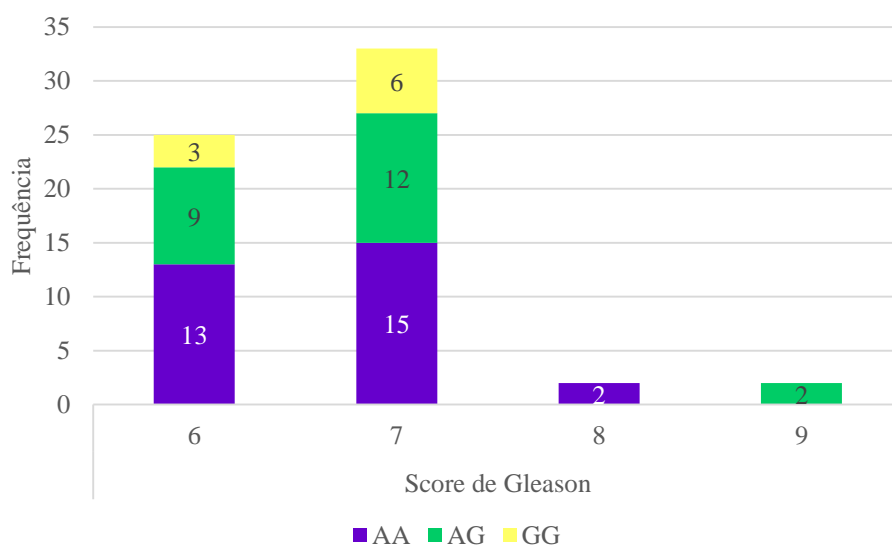


Gráfico 6 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 pelo *score* de Gleason.

O T mais frequente foi o 2c, que consiste no envolvimento de ambos os lobos da próstata, seguido pelo 2a, tumor unilateral com metade ou menos do lobo ocupado.

Relativamente à distribuição do T segundo o genótipo correspondente, apresentada no Gráfico 7, verificou-se existir uma associação significativa ao nível de 0,1 ($p\text{-value} = 0,08$) cujo coeficiente de contingência é 0,511. De forma a compreender melhor este valor, testaram-se as hipóteses de associação entre a presença do alelo A ou do alelo G e o T. Verificou-se existir associação estatisticamente significativa entre a presença do alelo A e o T ($p\text{-value} = 0,046$) com coeficiente de contingência de 0,433, mas não para a presença do alelo G ($p\text{-value} = 0,367$).

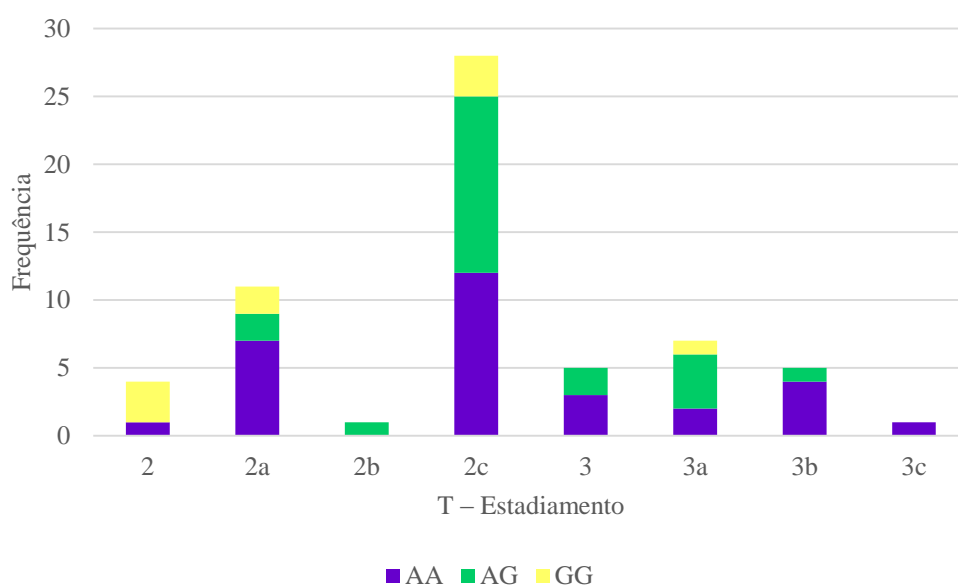


Gráfico 7 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 pelo T do estadiamento tumoral.

O valor médio do PSA total, disponível em 60 dos 62 casos de AP, foi de 8,23 ng/ml, com um desvio padrão de 4,29 ng/ml (Tabela 8). Na Tabela 8 observa-se ainda que a média dos níveis de PSA é mais elevada para o genótipo GG e menor para o genótipo AG, sendo também a que apresenta maior variação. Através da aplicação do teste estatístico Kruskal-Wallis verificou-se não existir diferença estatisticamente significativa nos valores médios do PSA total entre os três genótipos ($p\text{-value} = 0,714$).

Tabela 8 – Estatística descritiva dos níveis de PSA total de acordo com o genótipo do polimorfismo rs266882.

Genótipo (n)	PSA total (ng/ml)			
	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
AA (30)	8,05	4,85	0,01	22,60
AG (22)	7,98	2,13	5,45	14,00
GG (8)	9,56	6,45	0,01	19,53
Total (60)	8,23	4,29	0,01	22,60

O Gráfico 8 representa a distribuição dos genótipos segundo os níveis de PSA total. Como é observável, o número de casos com valores de PSA total no intervalo 4 a 8 é mais de metade de todos os casos observados. Não se verificou nenhuma associação estatística entre os valores de PSA total e os diferentes genótipos ($p\text{-value} = 0,116$). No entanto, na presença do alelo A, o coeficiente de contingência é 0,392, e apresenta um $p\text{-value}$ de 0,053, próximo do valor de significância de 0,05, o que constitui um indício de associação entre o PSA total e a presença do alelo A. No entanto, através do teste t não se verificou existir diferença entre os valores médios de PSA total do alelo A e alelo G ($p\text{-value} = 0,530$).

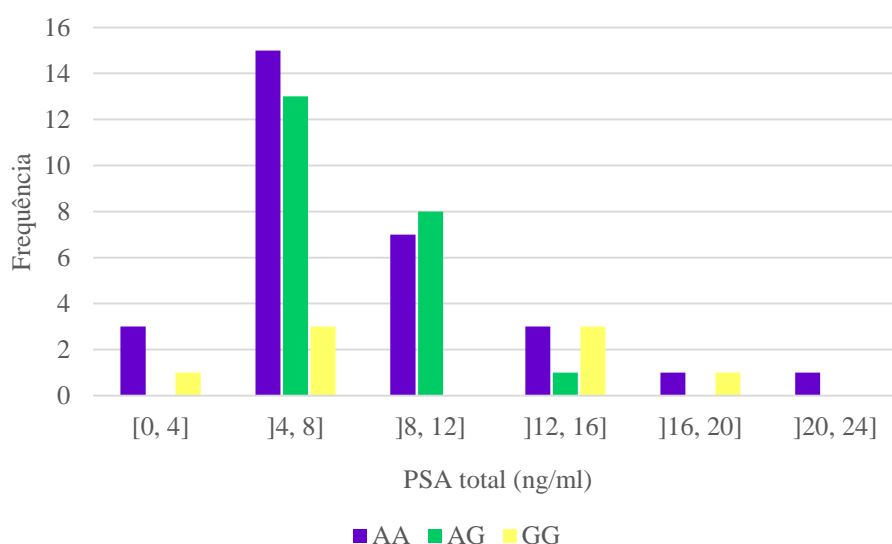


Gráfico 8 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 por níveis de PSA total.

O Gráfico 9 representa a distribuição do volume ocupado pelo tumor segundo o genótipo, esta informação estava apenas disponível em 50 dos 62 casos em que foi obtido resultado de restrição. Não foi verificada associação entre o genótipo e o volume do AP ($p\text{-value} = 0,372$).

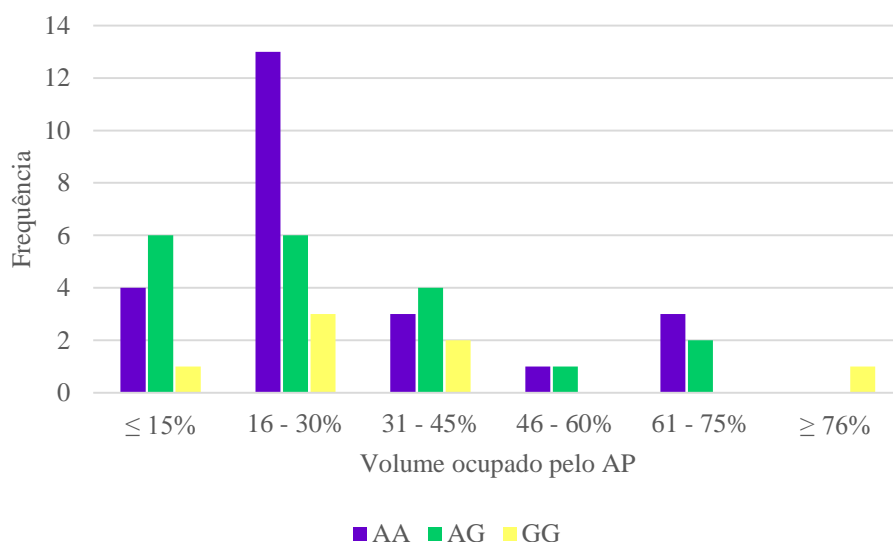


Gráfico 9 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs266882 de acordo com o volume prostático ocupado por AP.

A invasão vascular mostrou ser um evento raro apenas observado em três casos (4,8%), um com genótipo AA e dois com genótipo AG (Tabela 9), não se verificando associação entre as variáveis ($p\text{-value} = 0,510$).

Tabela 9 – Frequência da invasão vascular segundo os genótipos do polimorfismo rs266882.

Genótipo	Invasão Vascular (n, (%))		
	Presente	Ausente	Total
AA	1 (1,6%)	29 (46,8%)	30 (48,4%)
AG	2 (3,2%)	21 (33,9%)	23 (37,1%)
GG	0 (0%)	9 (14,5%)	9 (14,5%)
Total	3 (4,8%)	59 (95,2%)	62 (100%)

A invasão perineural ocorreu em 69,4% dos casos de AP em que obtivemos genótipos, com a distribuição que se observa na Tabela 10, não existindo associação estatística entre estas duas ($p\text{-value} = 0,215$).

Tabela 10 – Frequência da invasão perineural segundo os genótipos do polimorfismo rs266882.

Genótipo	Invasão Perineural (n, (%))		
	Presente	Ausente	Total
AA	18 (29,0%)	12 (19,4%)	30 (48,4%)
AG	17 (27,4%)	6 (9,7%)	23 (37,1%)
GG	8 (12,9%)	1 (1,6%)	9 (14,5%)
Total	43 (69,4%)	19 (30,7%)	62 (100%)

A invasão capsular estava presente em dez casos com genótipo AA, o que corresponde a metade dos casos com este genótipo (Tabela 11). Situação idêntica foi verificada no genótipo AG. O genótipo e invasão capsular não apresentaram associação estatisticamente significativa ($p\text{-value} = 0,780$).

Tabela 11 – Frequência da invasão capsular segundo os genótipos do polimorfismo rs266882.

Genótipo	Invasão Capsular (n, (%))		
	Presente	Ausente	Total
AA	10 (16,1%)	20 (32,2%)	30 (48,4%)
AG	8 (12,9%)	15 (24,2%)	23 (37,1%)
GG	2 (3,2%)	7 (11,3%)	9 (14,5%)
Total	20 (32,2%)	42 (67,7%)	62 (100%)

Considerando que o polimorfismo estudado se localiza no gene *KLK3* que codifica para a proteína PSA, tornou-se pertinente verificar a existência de associação entre o PSA total e outras variáveis como o *score* de Gleason, o T ou o volume prostático ocupado pelo tumor.

O Gráfico 10 permitiu observar que os *scores* de Gleason mais elevados não são os que apresentam valores de PSA total mais elevados. Através de análise estatística com o teste de Spearman verificou-se não existir associação entre os níveis de PSA total e o *score* de Gleason ($\rho = 0,688$).

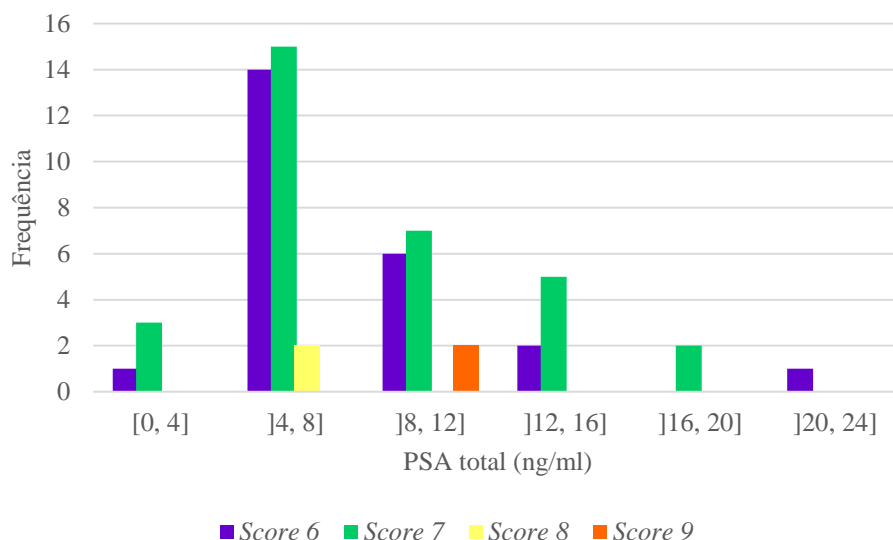


Gráfico 10 – Distribuição do *score* de Gleason de acordo com os níveis de PSA total.

Através do cruzamento de dados do PSA total e o T do estadiamento tumoral (Tabela 12) verifica-se que a maioria dos casos com T de 2c apresenta níveis de PSA total entre 4 e 8 ng/ml. Utilizando o teste de Spearman verifica-se que não há associação estatística significativa entre estas variáveis ($\rho = 0,267$).

Tabela 12 – Distribuição do T de estadiamento tumoral de acordo com os níveis de PSA total.

PSA total (ng/ml)	T – Estadiamento tumoral							
	2	2a	2b	2c	3	3a	3b	3c
[0, 4]	0	1	0	2	1	0	0	0
]4, 8]	3	6	0	15	2	3	1	1
]8, 12]	0	2	1	6	2	2	2	0
]12, 16]	1	1	0	2	0	1	2	0
]16, 20]	0	1	0	0	0	1	0	0
]20, 24]	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	4 (6,7%)	11 (18,3%)	1 (1,7%)	26 (43,3%)	5 (8,3%)	7 (11,7%)	5 (8,3%)	1 (1,7%)
	60							

Na Tabela 13 é apresentada a distribuição dos níveis de PSA total, tendo em consideração o volume ocupado pelo tumor. Verificou-se existir correlação estatisticamente significativa, ainda que apenas moderadamente positiva, entre os níveis de PSA total e o volume prostático ocupado pelo AP, através do teste estatístico de Spearman, cujo valor foi 0,348 ($\rho = 0,015$) com valor de significância de 0,05.

Tabela 13 – Distribuição volume prostático ocupado por AP de acordo com os níveis de PSA total.

PSA total (ng/ml)	Volume ocupado pelo AP					Total
	≤ 15%	16 – 30%	31 – 45%	46 – 60%	61 – 75%	
[0, 4]	1	1	1	0	0	3 (6,2%)
]4, 8]	7	11	3	0	1	22 (45,8%)
]8, 12]	2	6	2	1	3	14 (29,2%)
]12, 16]	0	1	3	1	1	6 (12,5%)
]16, 20]	0	2	0	0	0	2 (4,2%)
]20, 24]	0	1	0	0	0	1 (2,1%)
Total	10 (20,8%)	22 (45,8%)	9 (18,8%)	2 (4,2%)	5 (10,4%)	48

A medição da associação entre os níveis de PSA total e os diferentes tipos de invasão vascular, perineural e capsular não foi estatisticamente significativa em nenhuma das situações com os *p-values* a serem 0,852, 0,252 e 0,713 respetivamente.

4. Discussão

A alta taxa de incidência do AP a nível mundial torna esta patologia um alvo preferencial para os investigadores, em particular o estudo da sua vertente molecular. A diversidade de alterações genéticas que ocorrem nos AP, tal como noutras neoplasias, têm ainda muito de desconhecido. Um gene alvo da investigação sobre o cancro da próstata é o *KLK3* e, neste estudo, é feita a análise do genótipo do polimorfismo na posição -158 do ARE-I deste gene em homens com AP e HBP, a partir de material biológico arquivado no Serviço de Anatomia Patológica do CHBM. A determinação do genótipo para o polimorfismo rs266882 foi efetuada através da técnica de PCR-RFLP.

Obteve-se genótipo para o polimorfismo em questão, em 62 casos de AP (tecido tumoral e tecido normal) e 34 casos de HBP. A frequência dos genótipos foi AA (50%), seguido do AG (36,5%) e depois o GG (13,5%). Esta distribuição dos genótipos, que está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg é, no entanto, diferente do que foi verificada em estudos anteriores em homens de raça caucasiana, nomeadamente no estudo de Medeiros e colaboradores (2002), em que o genótipo mais verificado foi o AG, seguido pelo AA e só depois o GG (Jesser *et al.*, 2008; Sävblom *et al.*, 2009; Sivoňová *et al.*, 2012; W. M. Xue *et al.*, 2001). Neste estudo não foi possível recolher dados sobre a raça dos indivíduos. O genótipo foi idêntico para o tecido tumoral e tecido normal extraído do mesmo indivíduo.

A associação entre este SNP rs266882 e o diagnóstico de AP e HBP não foi observada. Diversos estudos apoiam este resultado tais como os de: Alptekin *et al.* (2012), Jesser *et al.* (2008), Sivoňová *et al.* (2012), Song *et al.* (2013), Salinas *et al.* (2005), Severi *et al.* (2006) e Wang *et al.* (2003). O único estudo publicado com indivíduos portugueses (Medeiros *et al.*, 2002) demonstrou existir associação entre a presença do alelo A e o risco de desenvolver AP, tal como Lai e colaboradores (2007) em homens australianos, e Soni e colaboradores (2012) em homens indianos. No entanto, existem outros estudos que associam ao risco de desenvolver AP com a presença do alelo G (Chiang *et al.*, 2004; Cicek *et al.*, 2005; Kalay *et al.*, 2009; W. Xue *et al.*, 2000).

Os *scores* de Gleason mais observados foram o 7 e o 6, 52,9% e 41,4% respetivamente, e não foi verificada associação com qualquer um dos genótipos ou alelos neste estudo. De facto, apenas foi encontrada associação entre o *score* de

Gleason e o polimorfismo rs266882 em três artigos (Gsur *et al.*, 2002; Kalay *et al.*, 2009; Schatzl *et al.*, 2005), sendo que a presença do alelo G e genótipo GG estão associados a AP mais agressivos (*score* de Gleason ≥ 7).

O valor médio de PSA total neste estudo foi de 8,23 ng/ml e, através da estratificação dos níveis de PSA total, verificamos que o intervalo de 4 a 8 ng/ml é o que apresenta maior frequência. Durante algum tempo o 4 ng/ml foi considerado valor limite no que respeita a efetuar uma abordagem mais invasiva para diagnosticar um possível AP, nomeadamente através da realização de biopsia transretal. No entanto, atualmente o valor limite varia com a idade como referido na Tabela 2. Considerando a média de idades do presente estudo de 67,8 anos e o valor médio do PSA total de 8,22 ng/ml, este está acima do valor referência para a idade. Analisando os cinco casos cujo valor de PSA total foi menor que 4 ng/ml, verificamos que, em todos, os valores de PSA total são inferiores aos valores referência para a idade. Três apresentam um valor quase residual de 0,01 ng/ml, enquanto os outros dois, um com 56 anos e PSA total de 0,66 ng/ml e o outro com 70 anos e 3,10 ng/ml, valores de PSA total que só por si não levantariam suspeitas em relação à existência de um AP. Num estudo recente de Randazzo e colaboradores (2015), que acompanhou durante 12 anos homens com PSA inferior a 1 ng/ml, demonstrou que homens com estes níveis base de PSA poderiam espaçar o período de análise de rotina por 8 anos sem que haja aumento significativo do risco de AP. Esta questão sugere a necessidade de realizar outras análises, nomeadamente moleculares, que contribuam para um diagnóstico correto o mais precoce possível.

Quando medida a associação entre o SNP -158 do ARE-I e o PSA total, verificamos que esta não existia, mas que a presença do alelo A estava próximo da significância (*p-value* = 0,053). Na literatura existem três estudos contraditórios quanto à associação do alelo A com os níveis de PSA: um que afirma que a presença deste alelo está associada a níveis mais baixos de PSA (Cramer *et al.*, 2008) e os outros que afirmam que esta presença está associada a níveis mais altos de PSA (Medeiros *et al.*, 2002; W. M. Xue *et al.*, 2001). No entanto, no presente estudo e através do teste t, verificou-se não existir diferença entre os dois alelos e os níveis de PSA total (*p-value* = 0,530). Lai e colaboradores (2007) estudaram a afinidade dos dois alelos do polimorfismo do ARE-I para o AR e verificaram que o alelo A apresentava duas vezes maior afinidade para este e também uma resposta mais efetiva ao nível da transcrição. Estudos *in silico* realizados pelos mesmos autores revelaram a existência de duas

pontes de hidrogénio extra entre o ARE-I com o alelo A e o domínio de ligação do AR, o que pode justificar as conclusões anteriores.

O estadiamento tumoral, principalmente o T, é importante na definição do grupo de prognóstico e consequente terapêutica. Neste trabalho, a maioria dos AP tiveram T igual a 2c, que consiste no envolvimento de ambos os lobos da próstata. Através do Coeficiente de Contingência foi verificado existir associação entre a presença do alelo A e o aumento do T ($p\text{-value} = 0,046$). Em estudos anteriores que avaliaram esta mesma associação, nenhum demonstrou estatisticamente a mesma (Lai *et al.*, 2007; Samzadeh *et al.*, 2012; Shibahara *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2003).

A relação do polimorfismo em estudo com o volume da próstata ocupado pelo tumor, não é dos aspetos mais avaliados na literatura e este último nem sempre é referido nos relatórios anátomo-patológicos, pois há quem o considere subjacente ao T. Contudo, neste trabalho pretendeu-se determinar a possível associação do volume ocupado pelo tumor e o polimorfismo rs266882, tal como tinha sido feito anteriormente por Cramer *et al.* (2008), Lai *et al.* (2007), Shibahara *et al.* (2006) e Wang *et al.* (2003), mas tal como eles não foi verificada associação estatística significativa.

Ao nível das invasões vascular, perineural e capsular pelo AP, apenas um estudo de Cramer e colaboradores (2008) optou por avaliar a possível relação com o polimorfismo -158 do ARE-I do gene *KLK3*, mas tal como no presente não houve qualquer associação estatisticamente significativa.

Voltando aos níveis de PSA total, obteve-se uma correlação moderadamente positiva entre estes e o volume ocupado pelo tumor ($\rho = 0,015$). Este facto é corroborado pelo estudo de Carvalhal e colaboradores (2010) que avaliou a relação dos níveis de PSA com o volume da próstata e o volume ocupado pelo tumor e concluiu que existia uma associação entre os níveis de PSA e o volume ocupado pelo tumor. Esta relação é facilmente explicada pelo facto de que a maioria dos tumores bem diferenciados produz elevadas quantidades de PSA e sendo estes de maior tamanho, maior será a quantidade libertada para o sangue.

A correlação entre os níveis de PSA e o *score* de Gleason e a existência de invasão vascular, perineural ou capsular não se verificou.

Uma das limitações deste estudo é o facto de a amostra ser relativamente pequena, pois limita um pouco a generalização das conclusões obtidas. Teria sido importante obter mais informação clínica sobre os indivíduos do estudo,

nomeadamente do grupo com HBP, pois esta era limitada aos dados fornecidos aquando da realização dos exames anátomo-patológicos. Outros dados que seriam relevantes para enriquecer este estudo eram a raça, hábitos tabágicos, índice de massa corporal, hábitos alimentares e história familiar de doenças oncológicas em particular de AP.

Outra limitação foi o facto de não ter sido possível efetuar sequenciação de pelo menos alguns casos de estudo, como forma de confirmação e até validação dos resultados obtidos. Considerando que não houve qualquer diferença no genótipo entre o tecido tumoral e o tecido normal, seria pertinente colher amostras de sangue ou do epitélio da cavidade oral para comparação.

A ausência de DNA após a extração em alguns casos, poderá estar relacionada com o processamento que as peças histológicas são submetidas para fixação dos tecidos. Esta é feita utilizando formol tamponado a 10%, que induz a formação de ligações cruzadas entre as proteínas o que pode dificultar a extração do DNA, bem como sua qualidade, mas também a impregnação em parafina dos fragmentos que, ao não ser adequadamente removida, pode impedir a realização das técnicas moleculares a realizar posteriormente.

O estudo de outros polimorfismos do gene *KLK3* seria bastante interessante pois permitiria conhecer melhor as características genéticas da população portuguesa. O estudo do gene *AR*, como foi abordado na introdução teórica, tem uma importância fulcral no desenvolvimento de tumores metastáticos e independentes da regulação dos androgénios.

A compreensão das razões que levam à maior agressividade dos AP enquanto outros permanecem indolentes é também uma área de estudo interessante, mas que implica, logo à partida, um período de acompanhamento dos homens muito longo.

5. Referências Bibliográficas

- Abouassaly, R., Thompson, I. M., Platz, E. A., & Klein, E. A. (2012). Epidemiology, Etiology, and Prevention of Prostate Cancer. In A. J. Wein, L. R. Kavoussi, A. C. Novick, A. W. Partin, & C. A. Peters (Eds.), *Campbell-Walsh Urology* (10th ed., pp. 2704–2725.e7). Philadelphia: Elsevier Inc.
- Alptekin, D., Izmirli, M., Bayazit, Y., Luleyap, H. U., Yilmaz, M. B., Soyupak, B., ... Tansug, Z. (2012). Evaluation of the effects of androgen receptor gene trinucleotide repeats and prostate-specific antigen gene polymorphisms on prostate cancer. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 1424–1432.
- American Cancer Society. (2015). Cancer Facts and Figures 2015. Atlanta. Retrieved January 11, 2015, from <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>
- American Joint Committee on Cancer. (2009). Prostate Cancer Staging.pdf. 7th Edition. Retrieved February 5, 2015, from <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/ProstateSmall.pdf>
- American Joint Committee on Cancer. (2015). AJCC - What is Cancer Staging? Retrieved January 17, 2015, from <https://cancerstaging.org/references-tools/Pages/What-is-Cancer-Staging.aspx>
- Arora, K. (2014). Prostate - Histology. *Prostate gland and seminal vesicles*. Retrieved January 15, 2015, from <http://www.pathologyoutlines.com/topic/prostatehistology.html>
- Balk, B. S. P., Ko, Y., & Bubley, G. J. (2003). Biology of Prostate-Specific Antigen. *Journal of Clinical Oncology*, 21, 383–391.
- Berman, D. M., Rodriguez, R., & Veltri, R. W. (2012). Development, Molecular Biology, and Physiology of the Prostate. In A. J. Wein, L. R. Kavoussi, A. C. Novick, A. W. Partin, & C. A. Peters (Eds.), *Campbell-Walsh Urology* (10th ed., pp. 2533–2569.e11). Elsevier Inc.
- Bhatia-Gaur, R., Donjacour, a. a, Sciavolino, P. J., Kim, M., Desai, N., Young, P., ... Others. (1999). Roles for Nkx3. 1 in prostate development and cancer. *Genes & Development*, 13, 966–977.
- Borgoño, C. A., & Diamandis, E. P. (2004). The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 4(11), 876–890.
- Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., ... Timms, B. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer*, 101(October), 2371–2490.

- Bostwick, D. G., Cheng, L., & Meiers, I. (2014). Neoplasms of the prostate. In D. G. Bostwick & L. Cheng (Eds.), *Urologic Surgical Pathology* (3rd ed., pp. 408–531.e46). Philadelphia: Saunders.
- Bowen, C., Ju, J. H., Lee, J. H., Paull, T., & Gelmann, E. (2013). Functional activation of ATM by the prostate cancer suppressor NKX3.1. *Cell Reports*, 4(3), 516–529.
- Brase, J. C., Johannes, M., Schlomm, T., Haese, A., Steuber, T., Beissbarth, T., ... Sültmann, H. (2011). Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 128, 608–616.
- Burdova, A., Bouchal, J., Tavandzis, S., & Kolar, Z. (2014). TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic*, 158(4), 502–510.
- Carvalho, G. F., Daudi, S. N., Kan, D., Mondo, D., Roehl, K. A., Loeb, S., & Catalona, W. J. (2010). Correlation between Serum PSA and Cancer Volume in Prostate Glands of Different Sizes. *Urology*, 76(5), 1072–1076.
- Chan, J. M., Stampfer, M. J., Ma, J., Gann, P. H., Gaziano, J. M., & Giovannucci, E. L. (2001). Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health Study 1 – 3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 549–554.
- Chappell, W. H., Lehmann, B. D., Terrian, D. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., & McCubrey, J. a. (2012). p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell Cycle*, 11, 4579–4588.
- Cheng, C. W., Chan, L. W., Ng, C. F., Chan, C. K., Tse, M. K. G., & Lai, M. M. F. (2006). Breast metastasis from prostate cancer and interpretation of immunoreactivity to prostate-specific antigen. *International Journal of Urology*, 13(May 2005), 463–465.
- Chiang, C.-H., Chen, K.-K., Chang, L. S., & Hong, C.-J. (2004). The impact of polymorphism on prostate specific antigen gene on the risk, tumor volume and pathological stage of prostate cancer. *The Journal of Urology*, 171(201), 1529–1532.
- Chung, B. I., Sommer, G., & Brooks, J. D. (2012). Anatomy of the Lower Urinary Tract and Male Genitalia. In A. J. Wein, L. R. Kavoussi, A. C. Novick, A. W. Partin, & C. A. Peters (Eds.), *Campbell-Walsh Urology* (10th ed., pp. 33–70.e2). Elsevier Inc.
- Cicek, M. S., Liu, X., Casey, G., & Witte, J. S. (2005). Role of androgen metabolism genes CYP1B1, PSA/KLK3, and CYP11 α in prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 14(September), 2173–2177.

- Cleutjens, K. B., van der Korput, H. a, van Eekelen, C. C., van Rooij, H. C., Faber, P. W., & Trapman, J. (1997). An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(January), 148–161.
- Cookson, M. S. (2012). Anatomy and Principles of Excision of the Prostate. In J. A. Smith, S. S. Howards, & G. M. Preminger (Eds.), *Hinman's Atlas of Urologic Surgery* (3rd ed., pp. 395–401). Elsevier Saunders.
- Cramer, S. D., Sun, J., Zheng, S. L., Xu, J., & Peehl, D. M. (2008). Association of prostate-specific antigen promoter genotype with clinical and histopathologic features of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(9), 2451–2457.
- Cronauer, M. V, Schulz, W. a, Burchardt, T., Ackermann, R., & Burchardt, M. (2004). Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. *Oncogene*, 23, 3541–3549.
- Damjanov, I. (2009). The male genital system. In I. Damjanov (Ed.), *Pathology Secrets* (3rd ed., pp. 329–338). Philadelphia: Mosby, Inc.
- Deters, L. A., Kim, E. D., Leveillee, R. J., Moore, C. R., & Patel, V. R. (2014). Benign Prostatic Hypertrophy. Retrieved from <http://emedicine.medscape.com/article/437359-overview#overview>
- Dijkstra, S., Mulders, P. F. a, & Schalken, J. a. (2014). Clinical use of novel urine and blood based prostate cancer biomarkers: A review. *Clinical Biochemistry*, 47(10-11), 889–896.
- Direção-Nacional da Saúde. (2013). *Portugal Doenças Oncológicas em Números – 2013*. (Direção-Nacional da Saúde, Ed.). Lisboa.
- Egevad, L., Mazzucchelli, R., & Montironi, R. (2012). Implications of the international society of urological pathology modified gleason grading system. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 136(April), 426–434.
- Epstein, J. I. (2012). Pathology of Prostatic Neoplasia. In A. J. Wein, L. R. Kavoussi, A. C. Novick, A. W. Partin, & C. A. Peters (Eds.), *Campbell-Walsh Urology* (10th ed., pp. 2726–2734.e3). Elsevier Inc.
- ERSPC - European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. (n.d.). Retrieved February 15, 2015, from <http://www.erspc.org/>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

- Fine, S. W., Amin, M. B., Berney, D. M., Bjartell, A., Egevad, L., Epstein, J. I., ... Stief, C. (2012). A contemporary update on pathology reporting for prostate cancer: biopsy and radical prostatectomy specimens. *European Urology*, 62(1), 20–39.
- Fu, L., Ding, Y., Wu, L., Wen, C., Qu, Q., Zhang, X., & Zhou, H. (2014). The Effects of Lycopene on the Methylation of the GSTP1 Promoter and Global Methylation in Prostatic Cancer Cell Lines PC3 and LNCaP. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 1–9.
- Gonzales, J. C., Fink, L. M., Goodman, O. B., Symanowski, J. T., Vogelzang, N. J., & Ward, D. C. (2011). Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 9(1), 39–45.
- Gooch, J. W. (2011). Male Reproductive System. In L. P. Gartner & J. L. Hiatt (Eds.), *Color Textbook of Histology* (3rd ed., pp. 489–510). Philadelphia: Saunders.
- Green, S. M., Mostaghel, E. A., & Nelson, P. S. (2012). Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 360(1–2), 3–13.
- Gsur, A., Preyer, M., Haidinger, G., Zidek, T., Madersbacher, S., Schatzl, G., ... Micksche, M. (2002). Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene , prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*, 23(10), 1647–1651.
- Gurel, B., Iwata, T., Koh, C. M., Jenkins, R. B., Lan, F., Van Dang, C., ... De Marzo, A. M. (2008). Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21, 1156–1167.
- Hassan, M. I., Kumar, V., Singh, T. P., & Yadav, S. (2007). Structural model of human PSA: a target for prostate cancer therapy. *Chemical Biology & Drug Design*, 70(1), 261–267.
- Heidenreich, A., Bastian, P. J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M. . D., ... Zattoni, F. (2012). *Guidelines on Prostate Cancer*. *European Association of Urology*.
- Huang, J. G., Campbell, N., & Goldenberg, S. L. (2014). PSA and beyond : Biomarkers in prostate cancer. *British Columbia Medical Journal*, 56(7), 334–341.
- Jesser, C., Mucci, L., Farmer, D., Moon, C., Li, H., Gaziano, J. M., ... Kantoff, P. (2008). Effects of G/A polymorphism, rs266882, in the androgen response

- element 1 of the PSA gene on prostate cancer risk, survival and circulating PSA levels. *British Journal of Cancer*, 99(10), 1743–1747.
- Kalay, E., Ergen, A., Narter, F., Agaçhan, B., Görmüş, U., Yigit, N., & Isbir, T. (2009). ARE-I polymorphism on PSA gene in prostate cancer patients of a Turkish population. *Anticancer Research*, 29(4), 1395–1398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414393>
- Kenfield, S. A., Stampfer, M. J., Chan, J. M., & Giovannucci, E. (2011). Smoking and Prostate Cancer Survival and Recurrence. *Journal American Medical Association*, 305(24), 2548–2555.
- Klezovitch, O., Risk, M., Coleman, I., Lucas, J. M., Null, M., True, L. D., ... Vasioukhin, V. (2008). A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2105–2110.
- Kuasne, H., Rodrigues, I. S., Fuganti, P. E., Losi-Guembarovski, R., Ito, K., Kishima, M. O., ... Cólus, I. M. de S. (2010). Polymorphisms in the AR and PSA genes as markers of susceptibility and aggressiveness in prostate cancer. *Cancer Investigation*, 28(9), 917–924.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2013). Male Genital System and Lower Urinary Tract. In V. Kumar, A. K. Abbas, & J. C. Aster (Eds.), *Robbins Basic Pathology* (9th ed., pp. 657–679).
- Lai, J., Kedda, M.-A., Hinze, K., Smith, R. L. G., Yaxley, J., Spurdle, A. B., ... Clements, J. a. (2007). PSA/KLK3 AREI promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, 28(5), 1032–1039.
- Lessick, M., & Katz, A. (2006). A Genetics Perspective on Prostate Cancer. *Urologic Nursing*, 26(6), 454–460. Retrieved from http://www.medscape.com/viewarticle/551564_2
- Li, J. (1997). PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. *Science*, 275(5308), 1943–1947.
- Li, L., Hsieh, A. C., Ruggero, D., Greene, K. L., & Carroll, P. R. (2015). Molecular Basis of Prostate Cancer. In J. Mendelsohn, J. W. Gray, P. M. Howley, M. A. Israel, & C. B. Thompson (Eds.), *The Molecular Basis of Cancer* (4th ed., pp. 549–560). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Lin, X., Tascilar, M., Lee, W. H., Vles, W. J., Lee, B. H., Veeraswamy, R., ... Nelson, W. G. (2001). GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *The American Journal of Pathology*, 159(5), 1815–1826.
- Liu, J., Zhang, J. S., Young, C. Y. F., & Kao, P. C. (2003). Polymorphisms of Prostate-Specific Antigen Gene Promoter: Determination From Cord Blood

- Collected on Filter Paper. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 33(4), 429–434.
- Maldonado, L., Brait, M., Loyo, M., Sullenberger, L., Wang, K., Peskoe, S. B., ... Sidransky, D. (2014). GSTP1 promoter methylation is associated with recurrence in early stage prostate cancer. *The Journal of Urology*, 192(5), 1542–1548.
- Martinez, E. E., Darke, A. K., Tangen, C. M., Goodman, P. J., Fowke, J. H., Klein, E. a, & Abdulkadir, S. a. (2014). A functional variant in NKX3.1 associated with prostate cancer risk in the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 7(September), 950–958.
- Mayo Clinic. (n.d.). Prostate-Specific Antigen (PSA), Total and Free Serum. Retrieved February 7, 2015, from <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/81944>
- Mcmenamin, M. E., Soung, P., & Perera, S. (1999). Loss of PTEN Expression in Paraffin-embedded Primary Prostate Cancer Correlates with High Gleason Score and Advanced Stage Loss of PTEN Expression in Paraffin-embedded Primary Prostate Cancer Correlates with High Gleason Score and Advanced Stage 1. *Cancer Research*, 59(43), 4291–4296.
- Medeiros, R., Morais, A., Vasconcelos, A., Costa, S., Pinto, D., Oliveira, J., ... Lopes, C. (2002). Linkage between polymorphisms in the prostate specific antigen ARE1 gene region, prostate cancer risk, and circulating tumor cells. *Prostate*, 53(February), 88–94.
- Melnik, B. C., John, S. M., Carrera-Bastos, P., & Loren, C. (2012). Cow's Milk-Mediated mTORC1-Signaling and Prostate Cancer. *Nutrition and Metabolism*. Retrieved January 31, 2015, from <http://www.medscape.com/viewarticle/777311>
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., ... Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10513–10518.
- Muruve, N. A. (2013). Prostate Anatomy. Retrieved from <http://emedicine.medscape.com/article/1923122-overview#aw2aab6b3>
- NCBI. (n.d.-a). Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs266882. *dbSNP Short Genetics Variations*. Retrieved February 11, 2015, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=266882
- NCBI. (n.d.-b). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Retrieved January 17, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>

- Nelson, C. C., Hendy, S. C., Shukin, R. J., Cheng, H., Bruchovsky, N., Koop, B. F., & Rennie, P. S. (1999). Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(February), 2090–2107.
- Nelson, W. G., Carter, H. B., Deweese, T. L., Antonarakis, E. S., & Eisenberger, M. A. (2014). Prostate Cancer. In J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, J. H. Doroshow, M. B. Kastan, & J. E. Tepper (Eds.), *Abeloff's Clinical Oncology* (5th ed., pp. 1463–1496.e9). Elsevier Inc.
- Nolte, F. S., & Hill, C. E. (2011). Polymerase Chain Reaction and Other Nucleic Acid Amplification Technology. In M. R. McPherson, Richard A. and Pincus (Ed.), *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (22nd ed., pp. 1271–1281.e1). Elsevier Inc.
- Ovalle, W. K., & Nahirney, P. C. (2013). Male Reproductive System. In W. K. Ovalle & P. C. Nahirney (Eds.), *Netter's Essential Histology* (2nd ed., pp. 381–402). Saunders.
- Petrovics, G., Liu, A., Shaheduzzaman, S., Furusato, B., Sun, C., Chen, Y., ... Srivastava, S. (2005). Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene*, 24, 3847–3852.
- Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2012). Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. *Science Translational Medicine*, 4(127).
- Randazzo, M., Beatrice, J., Huber, A., Grobholz, R., Manka, L., Chun, F. K., ... Kwiatkowski, M. (2015). Is further screening of men with baseline PSA < 1 ng ml⁻¹ worthwhile? The discussion continues-Results of the Swiss ERSPC (Aarau). *International Journal of Cancer*, 1.
- Rao, A., Chang, B.-L. ., Hawkins, G., Hu, J. J., Rosser, C. J., Hall, M. C., ... Cramer, S. D. (2003). Analysis of G/A polymorphism in the androgen response element I of the PSA gene and its interactions with the androgen receptor polymorphisms. *Urology*, 61(4), 864–869.
- Ro, J. Y., Kim, K., Shen, S. S., Amin, M. B., & Ayala, A. G. (2013). Tumors and Tumor-like Conditions of the Male Genital Tract. In C. D. M. Fletcher (Ed.), *Diagnostic Histopathology of Tumors: 2 Volume Set* (4th ed., pp. 872–1030). Philadelphia: Elsevier Inc.
- Roddam, A. W., Allen, N. E., Appleby, P., Key, T. J., Ferrucci, L., Carter, H. B., ... Galan, P. (2008). Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: Analysis of individual patient data from 12 prospective studies. *Annals of Internal Medicine*, 149(7), 461–471.
- Roehrborn, C. G. (2008). Pathology of benign prostatic hyperplasia. *International Journal of Impotence Research*, 20 Suppl 3, S11–S18.

- Rohrmann, S., Genkinger, J., Burke, A., Helzlsouer, K. J., Comstock, G., Alberg, A. J., & Platz, E. a. (2007). Smoking and risk of fatal prostate cancer in a prospective US study. *Urology*, 69(4), 721–725.
- Romero Otero, J., Garcia Gomez, B., Campos Juanatey, F., & Touijer, K. a. (2014). Prostate cancer biomarkers: An update. *Urologic Oncology*, 32(3), 252–260.
- Rosai, J. (2011). Male reproductive system. In J. Rosai (Ed.), *Rosai & Ackerman's Surgical Pathology* (10th ed., pp. 1287–1398). Elsevier Inc.
- Salinas, C. A., Austin, M. A., Ostrander, E. O., & Stanford, J. L. (2005). Polymorphisms in the androgen receptor and the prostate-specific antigen genes and prostate cancer risk. *Prostate*, 65(October 2004), 58–65.
- Samzadeh, M., Hasanzad, M., Jamaldini, S. H., Hagh-, A. A., Afshari, M., Amir, S., & Ziaee, M. (2012). Association of G/A Polymorphism, rs266882, in AREI Region of the Prostate-Specific Antigen Gene with Prostate Cancer Risk and Clinicopathological Features. *Cellular and Molecular Urology*, 9(4), 691–699.
- Saramäki, O. R., Tammela, T. L. J., Martikainen, P. M., Vessella, R. L., & Visakorpi, T. (2006). The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 45(7), 639–645.
- Saraon, P., Jarvi, K., & Diamandis, E. P. (2011). Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence. *Clinical Chemistry*, 57, 1366–1375.
- Sävblom, C., Giwercman, a., Malm, J., Halldén, C., Lundin, K., Lilja, H., & Giwercman, Y. (2009). Association between polymorphisms in the prostate-specific antigen (PSA) promoter and release of PSA. *International Journal of Andrology*, 32, 479–485.
- Schatzl, G., Marberger, M., Remzi, M., Grösser, P., Unterlechner, J., Haidinger, G., ... Gsur, A. (2005). Polymorphism in ARE-I region of prostate-specific antigen gene associated with low serum testosterone level and high-grade prostate cancer. *Urology*, 65, 1141–1145.
- Schlomm, T., Iwers, L., Kirstein, P., Jessen, B., Köllermann, J., Minner, S., ... Erbersdobler, A. (2008). Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21, 1371–1378.
- Schnekenburger, M., Karius, T., & Diederich, M. (2014). Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: From detoxification toward cancer prevention and diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, 5(July), 1–7.
- Schuur, E. R., Henderson, G. a, Kmetec, L. a, Miller, J. D., Lamparski, H. G., & Henderson, D. R. (1996). Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 7043–7051.

- Severi, G., Hayes, V. M., Neufing, P., Padilla, E. J. D., Tilley, W. D., Eggleton, S. a., ... Giles, G. G. (2006). Variants in the prostate-specific antigen (PSA) gene and prostate cancer risk, survival, and circulating PSA. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 15(June), 1142–1147.
- Shibahara, T., Onishi, T., Franco, O. E., Arima, K., Nishikawa, K., Yanagawa, M., ... Sugimura, Y. (2006). A G/A polymorphism in the androgen response element 1 of prostate-specific antigen gene correlates with the response to androgen deprivation therapy in Japanese population. *Anticancer Research*, 26, 3365–3371.
- Shukla, S., Shukla, M., MacLennan, G. T., Fu, P., & Gupta, S. (2009). Deregulation of FOXO3A During Prostate Cancer Progression. *International Journal of Oncology*, 34(6), 1613–1620.
- Sieh, W., Edwards, K. L., Fitzpatrick, A. L., Srinouanprachanh, S. L., Farin, F. M., Monks, S. A., ... Eaton, D. L. (2006). Genetic Susceptibility to Prostate Cancer: Prostate-specific Antigen and its Interaction with the Androgen Receptor (United States). *Cancer Causes & Control : CCC*, 17(2), 187–197.
- Sigounas, G., Anagnostou, A., & Steiner, M. (1997). dl- α -tocopherol induces apoptosis in erythroleukemia, prostate, and breast cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 28(1), 30–35.
- Sivoňová, M. K., Dobrota, D., Dušenka, R., Waczulíková, I., Slezák, P., Matáková, T., ... Kliment, J. (2012). Effect of CYP17 and PSA gene polymorphisms on prostate cancer risk and circulating PSA levels in the Slovak population. *Molecular Biology Reports*, 39(8), 7871–7880.
- Song, J., Park, H., & Lee, G. (2013). Contribution of genetic variation rs266882 to prostate-specific antigen levels in healthy controls with serum PSA below 2.0 ng/ml. *Biochemical Genetics*, 51, 264–274.
- Soni, A., Bansal, A., Mishra, A. K., Batra, J., Singh, L. C., Chakraborty, A., ... Saxena, S. (2012). Gene Polymorphisms with Prostate Carcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia in a North Indian Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(8), 835–840.
- Standring, S., Borley, N. R., Collins, P., Crossman, A. R., Gatzoulis, M. A., & Healy, J. C. (2008). Bladder, prostate and urethra. In S. Standring (Ed.), *Gray's Anatomy* (40th ed., pp. 1245–1259). Elsevier.
- Tan, H.-L., Sood, A., Rahimi, H. A., Wang, W., Gupta, N., Hicks, J., ... Lotan, T. L. (2014). Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(4), 890–903.
- Thangapazham, R., Saenz, F., Katta, S., Mohamed, A. a, Tan, S.-H., Petrovics, G., ... Dobi, A. (2014). Loss of the NKX3.1 tumorsuppressor promotes the

- TMPRSS2-ERG fusion gene expression in prostate cancer. *BMC Cancer*, 14, 16.
- Tomlins, S. A., Aubin, S. M. J., Siddiqui, J., Lonigro, R. J., Sefton-Miller, L., Miick, S., ... Chinnaiyan, A. M. (2011). Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Science Translational Medicine*, 3(94), 94ra72.
- UniProtKB/Swiss-Prot. (n.d.). KLK3 - Prostate-specific antigen precursor - Homo sapiens (Human). Retrieved February 4, 2015, from <http://www.uniprot.org/uniprot/P07288>
- Vander Griend, D. J., Litvinov, I. V., & Isaacs, J. T. (2014). Conversion of androgen receptor signaling from a growth suppressor in normal prostate epithelial cells to an oncogene in prostate cancer cells involves a gain of function in c-Myc regulation. *International Journal of Biological Sciences*, 10, 627–642.
- Wang, L. Z., Sato, K., Tsuchiya, N., Yu, J. G., Ohyama, C., Satoh, S., ... Kato, T. (2003). Polymorphisms in prostate-specific antigen (PSA) gene, risk of prostate cancer, and serum PSA levels in Japanese population. *Cancer Letters*, 202, 53–59.
- Wei, J. T. (2015). Urinary biomarkers for prostate cancer. *Current Opinion in Urology*, 25(1), 77–82.
- Weizmann Institute of Science. (2013). KLK3 Gene - GeneCards | KLK3 Protein | KLK3 Antibody. Retrieved June 19, 2014, from <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLK3&search=psa>
- Wilson, K. M., Kasperzyk, J. L., Rider, J. R., Kenfield, S., van Dam, R. M., Stampfer, M. J., ... Mucci, L. a. (2011). Coffee consumption and prostate cancer risk and progression in the Health Professionals Follow-up Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(11), 876–884.
- Xue, W., Irvine, R. A., Yu, M. C., Ross, R. K., Coetzee, G. A., & Ingles, S. A. (2000). Susceptibility to Prostate Cancer : Interaction between Genotypes at the Androgen Receptor and Prostate-specific Antigen Loci Advances in Brief Susceptibility to Prostate Cancer : Interaction between Genotypes at the Androgen Receptor and Prostate-specifi. *Cancer Research*, 60, 839–841.
- Xue, W. M., Coetzee, G. a, Ross, R. K., Irvine, R., Kolonel, L., Henderson, B. E., & Ingles, S. a. (2001). Genetic determinants of serum prostate-specific antigen levels in healthy men from a multiethnic cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 10(June), 575–579.
- Zeegers, M. P. a, Jellema, A., & Ostrer, H. (2003). Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer*, 97(8), 1894–1903.

Zhou, M., Netto, G. J., & Epstein, J. I. (2012). Anatomy and Histology of the Prostate. In M. Zhou, G. J. Netto, & J. I. Epstein (Eds.), *High-Yield Uro pathology* (pp. 2–6). Saunders.

6. Anexos

Anexo 1 – Estadiamento do Cancro da Próstata segundo a AJCC

Estadiamento do Cancro da Próstata

Tumor Primário	
Clínico (T)	
TX	Tumor primário não avaliável
T0	Sem evidência do tumor primário
T1	Tumor clinicamente impercetível, não palpável ou visível através de imagem
T1a	Tumor por achado histológico incidental em 5% ou menos do tecido ressecado
T1b	Tumor por achado histológico incidental em mais do que 5% do tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia com agulha (ex. devido a nível elevado de antigénio específico da próstata)
T2	Tumor limitado à próstata ¹
T2a	Tumor afeta metade de um lóbulo ou menos
T2b	Tumor afeta mais de metade de um lóbulo, mas não ambos os lóbulos
T2c	Tumor envolve ambos os lóbulos
T3	Tumor invade a cápsula da próstata ²
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor atinge a(s) vesícula(s) seminal(is)
T4	Tumor fixa-se ou atinge as estruturas adjacentes que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculo elevador do ânus e/ou parede pélvica
Patológico (pT) ³	
pT2	Confinado ao órgão
pT2a	Unilateral, metade de um dos lados ou menos
pT2b	Unilateral, envolvendo mais de metade de um dos lados, mas sem atingir os dois lados
pT2c	Bilateral
pT3	Extensão extraprostática
pT3a	Extensão extraprostática ou invasão microscópica do colo vesical ⁴
pT3b	Invasão das vesículas seminais
pT4	Invasão do reto, músculo elevador do ânus e/ou parede pélvica

Gânglios Linfáticos regionais (N)	
Clínico	
NX	Gânglios linfáticos regionais não avaliáveis
N0	Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases no(s) gânglio(s) linfático(s)
Patológico	
pNX	Gânglios linfáticos regionais não ressecados
pN0	Gânglios linfáticos negativos
pN1	Metástases no(s) gânglio(s) linfático(s)

Metástases à Distância (M) ⁵	
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases à distância
M1a	Gânglio(s) não-regionais
M1b	Osso(s)
M1c	Outra(s) localização(ões)

¹ Um tumor descoberto num ou em ambos os lóbulos através de biópsia com agulha, mas não palpável ou visível através de imagem, é classificado como T1c.

² A invasão do ápex prostático, ou cápsula prostática (mas não para além desta), não se classifica como T3, mas sim como T2.

³ Não há classificação T1 patológica.

⁴ Margem cirúrgica positiva deve ser indicada com descrição R1 (doença residual microscópica).

⁵ Quando as metástases existem em mais do que uma localização, deve usar-se a categoria mais avançada – pM1c.

Estadio Anatómico/Grupos de Prognóstico ¹

Grupo	T	N	M	PSA	Gleason
I	T1a-c	N0	M0	< 10	≤ 6
	T2a	N0	M0	< 10	≤ 6
	T1-2a	N0	M0	X	X
IIA	T1a-c	N0	M0	< 20	7
	T1a-c	N0	M0	10 ≤ PSA < 20	≤ 6
	T2a	N0	M0	10 ≤ PSA < 20	≤ 6
	T2a	N0	M0	< 20	7
	T2b	N0	M0	< 20	≤ 7
	T2b	N0	M0	X	X
IIB	T2c	N0	M0	Qualquer	Qualquer
	T1-2	N0	M0	≥ 20	Qualquer
	T1-2	N0	M0	Qualquer	≥ 8
III	T3a-b	N0	M0	Qualquer	Qualquer
IV	T4	N0	M0	Qualquer	Qualquer
	Qualquer T	N1	M0	Qualquer	Qualquer
	Qualquer T	Qualquer N	M1	Qualquer	Qualquer

¹ Quando o valor de PSA ou o *score* de Gleason não estiverem disponíveis, o grupo deve ser determinado pelo T e/ou valor de PSA ou *score* de Gleason.

Anexo 2 – Parecer da Comissão Nacional de Proteção de Dados para a realização do estudo

Proc. N.º: 7800/2014 | 1



DELIBERAÇÃO N.º 7190 / 2014

Joana Sofia Cadilha Franco, no âmbito da sua tese de Mestrado em Biologia molecular em saúde, notificou à Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPD) um tratamento de dados pessoais com a finalidade de elaborar um estudo observacional retrospectivo de caracterização dos genes PSA e AR em adenocarcinomas da próstata.

O objectivo principal do estudo consiste em clarificar a fiabilidade do uso do PSA como marcador tumoral, pois muitas vezes o aumento dos níveis de PSA não é reflexo de neoplasia maligna, através do estudo de polimorfismos genéticos.

Serão utilizadas 150 peças de prostatectomia fixadas em formol com diagnóstico anátomo-patológico de adenocarcinoma prostático.

As amostras estão armazenadas no serviço de Anatomia patológica do Centro Hospitalar Barreiro-Montijo e estão identificadas apenas por um número de exame anátomo-patológico que não permite a identificação direta do titular.

A responsável não acederá a qualquer outro dado para além da amostra referida.

Pela análise dos dados recolhidos e da metodologia aplicada verifica-se que não há tratamento de dados pessoais, uma vez que em nenhum momento do estudo é possível o relacionamento direto da identificação dos titulares com as amostras objeto de análise e que a responsável afirma que não acederá indiretamente a essa identificação.



Assim, porque não existe tratamento de dados pessoais, não se aplica a Lei n.º 67/98, de 26 de outubro.

Lisboa, 19 de agosto de 2014

Ana Roque (Relatora)

Anexo 3 – Pedido de autorização ao Conselho de Administração e Serviço de Anatomia Patológica do CHBM

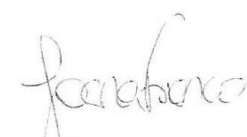
Estando os requisitos de confidencialidade de dados
arabidos bem como as devidas condições
consideradas pela Comissão de Ética e
elo Conselho de Administração, o SAT Almada, 27 de agosto de 2014
em todo o prazer e vantagens em
contribuir para a valorização Profissional
a requerente e na inves- Para: Diretora do serviço de Anatomia Patológica do CHBM
gação do tema em anexo. Não havendo mais - Dra. Isabel Andrade
nada para o serviço de anatomia
Obr. Isabel 27/10/2014 Superior.

No contexto do Mestrado em Biologia Molecular em Saúde da Escola Superior de Saúde Egas Moniz que frequento e no âmbito da investigação para a realização da tese de Mestrado, venho solicitar autorização para utilizar amostras de tumor da próstata de peças cirúrgicas de prostatectomia com diagnóstico de adenocarcinoma, existentes no serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Barreiro-Montijo. A utilização das amostras não tem qualquer custo para o CHBM.

O estudo tem como objetivos principais caracterizar a análise molecular dos polimorfismos ARE-I do gene KLK3 e AR-E211 do gene AR e inferir a existência de relação entre estes e o estadiamento tumoral.

Em anexo, envio sinopse do estudo e ainda parecer da Comissão Nacional de Proteção de Dados.

Ao dispor para qualquer esclarecimento adicional,


Joana Franco

Contatos:

Serviço de Anatomia Patológica do CHBM – extensão 7357/8

E-mail – joanacfranco@chbm.min-saude.pt

Telemóvel pessoal –

COMISSÃO DE ÉTICA
<i>Nº 2 - 0 PM</i>
Data <i>31/10/2014</i> <i>Isabel</i>

*À Com. Ética para
apreciar e parecer
07/10/14*

João Silveira Ribeiro
Presidente do Conselho de Administração

ENTRADA
Conselho de Administração
N.º <i>17475</i> <i>07/10/2014</i>
<i>M. Malato</i>

Anexo 4 – Deliberação da Comissão de Ética do CHBM para a realização do estudo



Téc. Joana Franco
Anat. Patol.

Apreciado em Reunião
do Conselho de Administração
CHBM, E. P. E.

de 06/11/2014
ACTA N.º 45

João Silveira Ribeiro
Presidente do Conselho de Administração

Memorando // Nota interna n.º: 33/2014

Data: 31 / 10 / 2014

De: Comissão de Ética para a Saúde

Para: Conselho de Administração

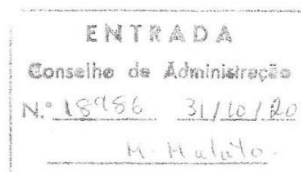
Assunto: Autorização para realização de trabalho científico

A trinta e um de outubro de dois mil e catorze reuniu a Comissão de Ética do Centro Hospitalar Barreiro Montijo, E.P.E. que apreciou um pedido de autorização utilização de amostras de tumor da próstata de peças cirúrgicas de prostatectomia com diagnóstico de adenocarcinoma existentes no Serviço de Anatomia Patológica deste Centro Hospitalar, no âmbito de um trabalho académico com objectivo principal de caracterizar a análise molecular dos poliformismos ARE-I do gene KLK3 e AR-E211 do gene AR a desenvolver por Joana Sofia Cadilha Franco, técnica de diagnóstico e terapêutica a exercer funções no Serviço de Anatomia Patológica do CHBM e aluna do mestrado em biologia molecular em saúde da Escola Superior de Saúde Egas Moniz em Lisboa. Face aos documentos apresentados, à Deliberação n.º 7190/2014 da Comissão Nacional de Protecção de Dados e do parecer favorável da Directora do referido Serviço, Isabel Andrade, referindo não haver inconveniência para o Serviço a Comissão de Ética deliberou nada ter a opor à realização desta recolha de amostras. Todavia, após conclusão, deverá ser remetido ao CHBM cópia do estudo.

Com os melhores cumprimentos

(Elvira Camacho, Dr.ª)

(Presidente da CES)



Anexo 5 – Protocolo de Coloração de Hematoxilina-Eosina em aparelho automático *TissueTek® DRS* (Sakura)

Protocolo de Coloração de Hematoxilina-Eosina

Xilol	4 minutos
Xilol	2 minutos
Álcool a 100%	1 minuto
Álcool a 96% (v/v)	30 segundos
Álcool a 70% (v/v)	30 segundos
Água corrente	1 minuto
Hematoxilina (Merck)	12 minutos
Água corrente	1:30 minutos
Diferenciador 1% Ácido Clorídrico em álcool a 70% (v/v)	5 segundos
Água corrente	2:30 minutos
Álcool a 70% (v/v)	20 segundos
Álcool a 96% (v/v)	20 segundos
Eosina alcoólica 0,2% (v/v)	1 minuto
Álcool a 96% (v/v)	30 segundos
Álcool a 100%	1 minuto
Xilol	30 segundos
Secagem a quente (62° C)	2:30 minutos

Anexo 6 – Quadros Referentes à Análise Estatística dos Resultados

Quadro 1 – Distribuição de diagnósticos.

		Diagnóstico			
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Adenocarcinoma	70	64,2	64,2	64,2
	HBP	39	35,8	35,8	100,0
	Total	109	100,0	100,0	

Quadro 2 – Estatística descritiva da idade de toda a amostra.

Statistics		
Idade		
N	Valid	109
	Missing	0
Mean		67,82
Median		68,00
Mode		70
Std. Deviation		7,279
Variance		52,985
Minimum		48
Maximum		90
Percentiles	25	64,00
	50	68,00
	75	72,50

Quadro 3 – Estatística descritiva da idade dos indivíduos com diagnóstico de AP.

AP Statistics		
Idade		
N	Valid	70
	Missing	0
Mean		65,81
Median		67,00
Mode		67
Std. Deviation		6,699
Variance		44,878
Minimum		48
Maximum		80
Percentiles	25	63,00
	50	67,00
	75	70,00

Quadro 4 – Estatística descritiva da idade dos indivíduos com diagnóstico de HBP.

HBP Statistics		
Idade		
N	Valid	39
	Missing	0
Mean		71,41
Median		70,00
Mode		70
Std. Deviation		6,961
Variance		48,459
Minimum		56
Maximum		90
Percentiles	25	68,00
	50	70,00
	75	76,00

Quadro 5 – Distribuição da amostra em estudo de acordo com a idade.

Idade (Agrupada)					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	<=50	3	2,8	2,8	2,8
	51-60	12	11,0	11,0	13,8
	61-70	62	56,9	56,9	70,6
	71-80	29	26,6	26,6	97,2
	>=81	3	2,8	2,8	100,0
	Total	109	100,0	100,0	

Quadro 6 – Distribuição dos indivíduos com AP de acordo com a idade.

AP – Idade Agrupada					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	<=50	3	4,3	4,3	4,3
	51-60	10	14,3	14,3	18,6
	61-70	43	61,4	61,4	80,0
	71-80	14	20,0	20,0	100,0
	Total	70	100,0	100,0	

Quadro 7 – Distribuição dos indivíduos com HBP de acordo com a idade.

HBP – Idade Agrupada					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	51-60	2	5,1	5,1	5,1
	61-70	19	48,7	48,7	53,8
	71-80	15	38,5	38,5	92,3
	>=81	3	7,7	7,7	100,0
	Total	39	100,0	100,0	

Quadro 8 – *Score* de Gleason dos indivíduos com AP.

Score de Gleason					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	6	29	41,4	41,4	41,4
	7	37	52,9	52,9	94,3
	8	2	2,9	2,9	97,1
	9	2	2,9	2,9	100,0
	Total	70	100,0	100,0	

Quadro 9 – T de Estadiamento tumoral dos indivíduos com AP.

T de Estadiamento tumoral					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	2	4	5,7	5,7	5,7
	2a	13	18,6	18,6	24,3
	2b	1	1,4	1,4	25,7
	2c	31	44,3	44,3	70,0
	3	5	7,1	7,1	77,1
	3a	9	12,9	12,9	90,0
	3b	6	8,6	8,6	98,6
	3c	1	1,4	1,4	100,0
	Total	70	100,0	100,0	

Quadro 10 – Estatística descritiva do PSA total dos indivíduos com diagnóstico de AP.

Statistics		
PSA total		
N	Valid	67
	Missing	3
Mean		8,2830
Median		7,5700
Mode		8,00
Std. Deviation		4,33679
Variance		18,808
Minimum		,01
Maximum		22,60
Percentiles	25	5,5500
	50	7,5700
	75	10,0000

Quadro 11 – Distribuição dos indivíduos com AP por níveis de PSA total.

PSA total (Agrupado)					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	<=4	5	7,1	7,5	7,5
	4-12	34	48,6	50,7	58,2
	8-12	16	22,9	23,9	82,1
	12-16	9	12,9	13,4	95,5
	16-20	2	2,9	3,0	98,5
	>20	1	1,4	1,5	100,0
	Total	67	95,7	100,0	
Missing	System	3	4,3		
Total		70	100,0		

Quadro 12 – Distribuição dos indivíduos com AP por volume prostático ocupado por tumor.

Volume do tumor (Agrupado)					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	<=15	17	24,3	30,4	30,4
	16-30	23	32,9	41,1	71,4
	31-45	9	12,9	16,1	87,5
	46-60	1	1,4	1,8	89,3
	61-75	5	7,1	8,9	98,2
	>=76	1	1,4	1,8	100,0
	Total	56	80,0	100,0	
Missing	System	14	20,0		
Total		70	100,0		

Quadro 13 – Existência de invasão vascular nos indivíduos com AP.

Invasão Vascular					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sim	4	5,7	5,7	5,7
	Não	66	94,3	94,3	100,0
	Total	70	100,0	100,0	

Quadro 14 – Existência de invasão perineural nos indivíduos com AP.

Invasão Perineural					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sim	49	70,0	70,0	70,0
	Não	21	30,0	30,0	100,0
	Total	70	100,0	100,0	

Quadro 15 – Existência de invasão capsular nos indivíduos com AP.

Invasão Capsular					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Sim	23	32,9	32,9	32,9
	Não	47	67,1	67,1	100,0
	Total	70	100,0	100,0	

Quadro 16 – Cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg retirado de <http://www.koonec.com/k-blog/2010/06/20/hardy-weinberg-equilibrium-calculator>.

		XX	XY	YY	Total	
Observed	n	48	35	13	96	192
	allele X	96	35	0	131	0,68
	allele Y	0	35	26	61	0,32
	Frequency	48	35	13	96	192
	%	50,00	36,46	13,54	100,00	
HW – Expected	Frequency	44,69	41,62	9,69	96,00	
	%	46,55	43,35	10,09	100,00	
	cell Chi-sq.	0,245	1,053	1,131	2,429	
p-value		0,1191				
		p≤0,05				

Quadro 17 – Genótipo do polimorfismo rs266882 no tecido tumoral de indivíduos com AP.

Genótipo tecido tumoral					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	AA	30	48,4	48,4	48,4
	AG	23	37,1	37,1	85,5
	GG	9	14,5	14,5	100,0
	Total	62	100,0	100,0	

Quadro 18 – Genótipo do polimorfismo rs266882 no tecido normal de indivíduos com AP.

Genótipo tecido normal					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	AA	30	48,4	48,4	48,4
	AG	23	37,1	37,1	85,5
	GG	9	14,5	14,5	100,0
	Total	62	100,0	100,0	

Quadro 19 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do diagnóstico e respectivo Coeficiente de Contingência.

Genótipo * Diagnóstico Crosstabulation

Count				
		Diagnóstico		Total
		Adenocarcinoma	HBP	
Genótipo tumor	AA	30	18	48
	AG	23	12	35
	GG	9	4	13
Total		62	34	96
Symmetric Measures				
			Value	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient		,049	,890
N of Valid Cases			96	

Quadro 20 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do *score* de Gleason e respectivo Coeficiente de Contingência.

Genótipo tumor * Score de Gleason Crosstabulation

Count		Score de Gleason				Total
		6	7	8	9	
Genótipo tumor	AA	13	15	2	0	30
	AG	9	12	0	2	23
	GG	3	6	0	0	9
Total		25	33	2	2	62
Symmetric Measures						
				Value	Approx. Sig.	
Nominal by Nominal Contingency Coefficient				,299	,414	
N of Valid Cases				62		

Quadro 21 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do T de estadiamento tumoral e respetivo Coeficiente de Contingência.

Genótipo tumor * T – Estadiamento TNM Crosstabulation

Count

		T – Estadiamento TNM								Total
		2	2a	2b	2c	3	3a	3b	3c	
Genótipo	AA	1	7	0	12	3	2	4	1	30
tumor	AG	0	2	1	13	2	4	1	0	23
	GG	3	2	0	3	0	1	0	0	9
Total		4	11	1	28	5	7	5	1	62
Symmetric Measures										
							Value	Approx. Sig.		
Nominal by Nominal		Contingency Coefficient					,511	,080		
N of Valid Cases							62			

Quadro 22 – Distribuição da presença do alelo A do polimorfismo rs266882 em função do T de estadiamento tumoral e respetivo Coeficiente de Contingência.

Alelo A * T – Estadiamento TNM Crosstabulation

Count

		T – Estadiamento TNM								Total
		2	2a	2b	2c	3	3a	3b	3c	
Alelo A	Alelo A	1	9	1	25	5	6	5	1	53
	Sem alelo A	3	2	0	3	0	1	0	0	9
Total		4	11	1	28	5	7	5	1	62
Symmetric Measures										
							Value	Approx. Sig.		
Nominal by Nominal		Contingency Coefficient					,433	,046		
N of Valid Cases							62			

Quadro 23 – Distribuição da presença do alelo G do polimorfismo rs266882 em função do T de estadiamento tumoral e respectivo Coeficiente de Contingência.

Alelo G * T – Estadiamento TNM Crosstabulation

Count		T – Estadiamento TNM								Total
		2	2a	2b	2c	3	3a	3b	3c	
Alelo G	Alelo G	3	4	1	16	2	5	1	0	32
	Sem alelo G	1	7	0	12	3	2	4	1	30
Total		4	11	1	28	5	7	5	1	62
Symmetric Measures										
						Value	Approx. Sig.			
Nominal by Nominal Contingency Coefficient						,331				
N of Valid Cases						62				

Quadro 24 – Estatística descritiva do PSA total em função do genótipo do polimorfismo rs266882.

Descriptives

PSA total								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
AA	30	8,0540	4,85437	,88628	6,2413	9,8667	,01	22,60
AG	22	7,9841	2,13305	,45477	7,0383	8,9298	5,45	14,00
GG	8	9,5638	6,45312	2,28152	4,1688	14,9587	,01	19,53
Total	60	8,2297	4,29213	,55411	7,1209	9,3384	,01	22,60

Quadro 25 – Teste de Kruskal Wallis para avaliar a diferenças entre os valores médios de PSA total de cada genótipo.

Ranks			
	Genótipo tumor	N	Mean Rank
PSA total	AA	30	28,72
	AG	22	31,86
	GG	8	33,44
	Total	60	
Test Statistics ^{a,b}			
	PSA total		
Chi-Square			
df			
Asymp. Sig.			

a. Kruskal Wallis Test; b. Grouping Variable: Genótipo tumor

Quadro 26 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função dos níveis de PSA total e respectivo Coeficiente de Contingência.

Genótipo tumor * PSA total (Agrupado) Crosstabulation

Count		PSA total (Agrupado)						Total
		<=4	4-8	8-12	12-16	16-20	>20	
Genótipo tumor	AA	3	15	7	3	1	1	30
	AG	0	13	8	1	0	0	22
	GG	1	3	0	3	1	0	8
Total		4	31	15	7	2	1	60
Symmetric Measures								
						Value	Approx. Sig.	
Nominal by Nominal Contingency Coefficient						,453	,116	
N of Valid Cases						60		

Quadro 27 – Distribuição do alelo A do polimorfismo rs266882 em função dos níveis de PSA total e respectivo Coeficiente de Contingência.

Crosstab

Count		PSA total (Agrupado)						Total
		<=4	4-8	8-12	12-16	16-20	>20	
Alelo A	Alelo A	3	28	15	4	1	1	52
	Sem alelo A	1	3	0	3	1	0	8
Total		4	31	15	7	2	1	60
Symmetric Measures								
						Value	Approx. Sig.	
Nominal by Nominal Contingency Coefficient						,392	,053	
N of Valid Cases						60		

Quadro 28 – Distribuição do alelo G do polimorfismo rs266882 em função dos níveis de PSA total e respectivo Coeficiente de Contingência.

		PSA total (Agrupado)						Total
		<=4	4-8	8-12	12-16	16-20	>20	
Alelo G	Alelo G	1	16	8	4	1	0	30
	Sem alelo G	3	15	7	3	1	1	30
Total		4	31	15	7	2	1	60
Symmetric Measures								
					Value	Approx. Sig.		
Nominal by Nominal		Contingency Coefficient			,190	,815		
N of Valid Cases					60			

Quadro 29 – Determinação da existência de diferença entre os valores de PSA total na presença do alelo A através do teste t.

Group Statistics						
Alelo A		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	
PSA total	Alelo A	52	8,0244	3,90824	,54198	
	Sem alelo A	8	9,5638	6,45312	2,28152	
Independent Samples Test						
			Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
			F	Sig.	t	df
PSA total	Equal variances assumed		6,449	,014	-,943	58
	Equal variances not assumed				-,656	7,809
Independent Samples Test						
			t-test for Equality of Means			
			Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	
PSA	Equal variances assumed		,349	-1,53933	1,63157	
total	Equal variances not assumed		,530	-1,53933	2,34501	
Independent Samples Test						
			t-test for Equality of Means			
			95% Confidence Interval of the Difference			
			Lower		Upper	
PSA	Equal variances assumed		-4,80528		1,72662	
total	Equal variances not assumed		-6,97006		3,89140	

Quadro 30 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função do volume prostático ocupado por tumor e respectivo Coeficiente de Contingência.

Genótipo tumor * Volume do tumor (Agrupado) Crosstabulation

Count		Volume do tumor (Agrupado)						Total
		<=15	16-30	31-45	46-60	61-75	>=76	
Genótipo	AA	4	13	3	1	3	0	24
tumor	AG	6	6	4	1	2	0	19
	GG	1	3	2	0	0	1	7
Total		11	22	9	2	5	1	50
Symmetric Measures								
					Value	Approx. Sig.		
Nominal by Nominal		Contingency Coefficient			,422	,372		
N of Valid Cases					50			

Quadro 31 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função da existência de invasão vascular e respectivo Coeficiente de Contingência.

Crosstab

Count				
		Invasão Vascular		Total
		Sim	Não	
Genótipo tumor	AA	1	29	30
	AG	2	21	23
	GG	0	9	9
Total		3	59	62
Symmetric Measures				
			Value	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient		,146	,510
N of Valid Cases			62	

Quadro 32 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função da existência de invasão perineural e respetivo Coeficiente de Contingência.

Crosstab

Count

		Invasão Perineural		Total
		Sim	Não	
Genótipo tumor	AA	18	12	30
	AG	17	6	23
	GG	8	1	9
Total		43	19	62
Symmetric Measures				
		Value		Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient	,217		,215
N of Valid Cases		62		

Quadro 33 – Distribuição do genótipo do polimorfismo rs266882 em função da existência de invasão capsular e respetivo Coeficiente de Contingência.

Crosstab

Count

		Invasão Cápsula		Total
		Sim	Não	
Genótipo tumor	AA	10	20	30
	AG	8	15	23
	GG	2	7	9
Total		20	42	62
Symmetric Measures				
		Value		Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient	,089		,780
N of Valid Cases		62		

Quadro 34 – Distribuição dos níveis de PSA total em função do *score* de Gleason e respetiva correlação de Spearman.

PSA total (Agrupado) * Score de Gleason Crosstabulation					
Count		Score de Gleason			
		6	7	8	9
		Total			
PSA total	<=4	1	3	0	0
(Agrupado)	4-8	14	15	2	0
	8-12	6	7	0	2
	12-16	2	5	0	0
	16-20	0	2	0	0
	>20	1	0	0	0
Total		24	32	2	2
Symmetric Measures					
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Interval by Interval	Pearson's R	,036	,102	,275	,785 ^c
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,053	,120	,404	,688 ^c
N of Valid Cases		60			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

Quadro 35 – Distribuição dos níveis de PSA total em função do T de estadiamento tumoral e respectiva correlação de Spearman.

PSA total (Agrupado) * T – Estadiamento TNM Crosstabulation

Count

		T – Estadiamento TNM								Total
		2	2a	2b	2c	3	3a	3b	3c	
PSA total	<=4	0	1	0	2	1	0	0	0	4
(Agrupado)	4-8	3	6	0	15	2	3	1	1	31
	8-12	0	2	1	6	2	2	2	0	15
	12-16	1	1	0	2	0	1	2	0	7
	16-20	0	1	0	0	0	1	0	0	2
	>20	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Total		4	11	1	26	5	7	5	1	60
Symmetric Measures										
						Asymp.				
						Value	Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.	
Interval by Interval	Pearson's R					,119	,125	,913	,365 ^c	
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation					,146	,130	1,121	,267 ^c	
N of Valid Cases						60				

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

Quadro 36 – Distribuição dos níveis de PSA total em função do volume prostático ocupado por tumor e respetiva correlação de Spearman.

PSA total (Agrupado) * Volume do tumor (Agrupado) Crosstabulation

Count

		Volume do tumor (Agrupado)					Total
		<=15	16-30	31-45	46-60	61-75	
PSA total (Agrupado)	<=4	1	1	1	0	0	3
	4-8	7	11	3	0	1	22
	8-12	2	6	2	1	3	14
	12-16	0	1	3	1	1	6
	16-20	0	2	0	0	0	2
	>20	0	1	0	0	0	1
Total		10	22	9	2	5	48
Symmetric Measures							
		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.		
Interval by Interval	Pearson's R	,250	,109	1,754	,086 ^c		
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	,348	,117	2,515	,015 ^c		
N of Valid Cases		48					

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

Quadro 37 – Distribuição dos níveis de PSA total em função da existência de invasão vascular e respectivo Coeficiente de Correlação.

Crosstab			
Count			
		Invasão Vascular	
		Sim	Não
		Total	
PSA total (Agrupado)	<=4	0	4
	4-8	1	30
	8-12	1	14
	12-16	1	6
	16-20	0	2
	>20	0	1
Total		3	57
Symmetric Measures			
		Value	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient	,177	,858
N of Valid Cases		60	

Quadro 38 – Distribuição dos níveis de PSA total em função da existência de invasão perineural e respectivo Coeficiente de Correlação.

Crosstab			
Count			
		Invasão Perineural	
		Sim	Não
		Total	
PSA total (Agrupado)	<=4	3	1
	4-8	18	13
	8-12	12	3
	12-16	6	1
	16-20	2	0
	>20	0	1
Total		41	19
Symmetric Measures			
		Value	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient	,315	,252
N of Valid Cases		60	

Quadro 39 – Distribuição dos níveis de PSA total em função da existência de invasão capsular e respectivo Coeficiente de Correlação.

Crosstab

Count		Invasão Cápsula		Total
		Sim	Não	
PSA total (Agrupado)	<=4	1	3	4
	4-8	9	22	31
	8-12	5	10	15
	12-16	4	3	7
	16-20	1	1	2
	>20	0	1	1
Total		20	40	60
Symmetric Measures				
			Value	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient		,215	,713
N of Valid Cases			60	